

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PAULO CILAS MORAIS LYRA JUNIOR**

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE  
NAFTOQUINONAS INÉDITAS E A RELAÇÃO COM ESPÉCIES  
REATIVAS DE OXIGÊNIO EM LINHAGEM DE CÉLULAS DE CÂNCER  
DE PULMÃO.**

**VITÓRIA  
2013**

**PAULO CILAS MORAIS LYRA JUNIOR**

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE  
NAFTOQUINONAS INÉDITAS E A RELAÇÃO COM ESPÉCIES  
REATIVAS DE OXIGÊNIO EM LINHAGEM DE CÉLULAS DE CÂNCER  
DE PULMÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção o título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leticia Batista Azevedo Rangel

**VITÓRIA  
2013**

---

Lyra Junior, Paulo Cilas Moraes, 1988-  
L992E      Estudo in vitro da atividade citotóxica de naftoquinonas  
inéditas e a relação com espécies reativas de oxigênio em  
linhagem de células de câncer de pulmão / Paulo Cilas Moraes Lyra  
Junior – 2013.  
75 f. : il.

Orientadora: Leticia Batista Azevedo Rangel.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito  
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Neoplasias pulmonares. 2. Naftoquinonas. 3. Espécies de  
oxigênio reativas. I. Rangel, Leticia Batista Azevedo. II.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da  
Saúde. III. Título.

CDU:61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

---

“Estudo in vitro da atividade citotóxica de naftoquinonas inéditas e a relação com espécies reativas de oxigênio em linhagem de células de câncer de pulmão”

Paulo Cilas Moraes Lyra Junior

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

Profª. Drª. Leticia Batista Azevedo Rangel (UFES)  
Orientadora

Profª. Drª. Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti (UFES)  
Membro Interno

Profª. Drª. Etel Rodrigues Pereira Gimba (INCA/UFF)  
Membro Externo

Vitória-ES, 20 de novembro de 2013.

À minha família e amigos que me apoiaram  
nessa caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

Sempre agradeço a Deus, pois sei que sem Ele e por vontade dEle nada poderia ser possível.

Minha mãe e meu pai, pelo amor sem limites, pelos conselhos e tudo mais.

Meus irmãos, Pauline e Gustavo, por me entenderem em todos os momentos.

Luisa, que por mais distantes que parecíamos estar, não estávamos.

Aos demais amigos que me deram forças para caminhar sempre mais um dia. Em especial à Cristiane Locatelli e Bianca de Paula por tão grande ajuda.

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Leticia Batista Azevedo Rangel, sem ela eu não poderia crescer tanto e encontrar um lugar que poderia chamar de segundo lar.

Aos amigos do LBCMCH pelo carinho e companheirismo, e por fazerem do nosso laboratório um verdadeiro lar.

Ao Laboratório de Pesquisas em Química Orgânica, do Departamento de Química, da Universidade Federal do Espírito Santo, especialmente ao Sandro Greco, pela parceria.

Ao Criobanco, especialmente ao Bruno e à Letícia, pela amizade e apoio.

As Agências de Fomento CAPES, FAPES e CNPq.

“Agora, se você sabe do teu valor, então vá atrás do que você merece, mas tem que estar preparado para apanhar e nada de apontar dedos, só os covardes fazem isso e você não é covarde, você é melhor que isso.”

Rocky Balboa

## RESUMO

O carcinoma de pulmão (CP) representa um grande desafio à saúde mundial, configurando-se como a principal causa mortis por câncer entre homens e mulheres e de difícil terapia por ser uma doença bastante heterogênea. Por isso a busca por novos agentes quimioterápicos mais eficazes é imperativa na tentativa de reduzir as mortes causadas por essa malignidade que acomete pessoas do mundo todo. Nesse ínterim, as atenções voltam-se para agentes novos de origem natural, pelo motivo de serem facilmente encontrados na natureza e consequentemente ter um preço de produção reduzido. Surge então o interesse pelo grupo das naftoquinonas, que fazem parte das quinonas, por serem de origem natural e podem ser encontrados amplamente na natureza. As naftoquinona apresentam diversos mecanismos de ação que podem causar citotoxicidade às células. Dentre os mecanismos de ação propostos para as naftoquinonas encontra-se o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) no microambiente. As EROs estão presentes naturalmente em organismos vivos, porém quando tornam-se acentuadamente elevados há ocorrência de um desbalanço-redox na célula e isso é associado à morte celular. No interesse de desenvolver uma terapia alternativa para pacientes acometidos com CP, nosso grupo, em parceria com o Laboratório de Pesquisas em Química Orgânica, analisou dois compostos inéditos naftoquinônicos –PIC20 e PIC21 - em linhagem de CP – H460 com o intuito de verificar a citotoxicidade dos novos compostos, como também avaliar se há ocorrência de alteração do perfil citotóxico dos compostos testados relacionado às EROs presentes nos ensaios in vitro. Observamos que PIC20 e PIC21 têm efeitos citotóxicos na linhagem de CP- H460 e que, possivelmente, a citotoxicidade pode estar relacionada às EROs, uma vez que o tratamento com cada composto associado ao superóxido dismutase alterou a viabilidade celular metabólica das células. Dessa forma, concluímos que os dois compostos têm potencial para se tornarem terapia alternativa para o CP, por terem efeitos citotóxicos em células H460, e o potencial citotóxico dos compostos pode estar associado à presença das EROs.

**Palavras-chave:** Neoplasias pulmonares, Naftoquinonas, Espécies de oxigênio reativas.



## ABSTRACT

Lung Cancer (LC) represents a challenge to the world health care, setting as the leading cause of cancer among men and women showing a difficult therapy to be a heterogeneous disease. Knowing that, new searches for chemotherapeutic agents more effective is imperative in order to reduce the deaths from this fellness that effects people into the worldwide. Thus, all attention is turning to new agents from natural origin, by reason of being found in nature easily and therefore and having a low cost price. The interest in the group of naphthoquinones that makes part of the quinines arises because it has a natural origin and can be found widely in nature. Naphthoquinone has associate several action mechanisms that can cause cytotoxicity to the cells. Among the action mechanisms proposed for the naphthoquinones is the increase of reactive oxygen species (ROS) into the microenvironment. The ROS are naturally into living organisms, however when they become markedly elevated there is an occurrence of redox-imbalance in the cell and it becomes associated to the cells death. Having an interest of developing an alternative therapy to patients affected with LC, our group, in partnership with a Research Laboratory of Organic Chemistry, analyzed two unheard naphthoquinones compounds – PIC20 and PIC21 – in line of LC – H460 in order to check the citotoxicity of the new tested compounds, and also evaluate if is happening an citotoxicity profile change of the tested compounds related to ROS present in the tumor microenvironment. We could noticed that PIC20 and PIC21 has citotoxicity effects in line of LC – H460 and the citotoxicity may be related to the presence of ROS (superoxide and hydrogen peroxide), since the treatment with each compound that is associated to superoxide dismutase that changed the profile of the cell viability.

**Key words:** Lung Cancer, Reactive Species of Oxygen, Naphthoquinones

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura dos diferentes derivados quinônicos.....	30
Figura 2 – Estrutura dos derivados do naftaleno (Lapachol e Lausona).....	31
Figura 3 - Esquema de produção de espécies reativas de oxigênio.....	34
Figura 4 – Esquema das reações que ocorrem para formação de radicais livre.....	35
Figura 5 - Comparação da viabilidade celular metabólica (VCM) da linhagem H460 após o tratamento com PIC20 (A) e PIC21 (B) por 24h.....	44
Figura 6 - Comparação da viabilidade celular metabólica (VCM) da linhagem H460 após o tratamento com PIC20 + SOD (A) e PIC21 + SOD (B) por 24h - .....	46
Figura 7 - Comparação dos efeitos do composto PIC20 sobre a viabilidade celular metabólica (VCM) na linhagem H460 após tratamento com PIC20 e PIC20 + SOD por 24h.....	47
Figura 8 - Comparação dos efeitos do composto PIC20 sobre a viabilidade celular metabólica (VCM) na linhagem H460 após tratamento com PIC21 e PIC21 + SOD por 24h:.....	48

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 – Definição do sistema de estadiamento TNM.....	18
TABELA 2 – Estadiamento do câncer de pulmão.....	20

## LISTA DE SIGLAS

$O_2^{\cdot -}$  - Superóxido

$H_2O_2$  – Peróxido de hidrogênio

AJCC – *American Joint Committee on cancer*

APAF-1 - Fator de ativação de protease associada à apoptose 1

CP – Câncer de pulmão

DMSO – Dimetilsulfóxido

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico

EO – Estresse Oxidativo

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FDA – Food and Drug Administration

HIF-1 $\alpha$  – Fator induzido por Hipoxia - 1 $\alpha$

MTT – Metil-Tiazol-Tetrazólio

PBS – Solução Tampão Salina

PI3K – Fosfatidil Inositol-3-Cinase

SFB – Soro Fetal Bovino

SOD – Superóxido Dismutase

VCM – Viabilidade Celular Metabólica

VCM (%) – Porcentagem da viabilidade Celular Metabólica

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1 CARCINOMA DE PULMÃO: EPIDEMIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA.....	14
2.2 ESTADIAMENTO DE NSCLC.....	17
2.3 TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO.....	20
2.4 QUIMIOTERÁPICOS NATURAIS.....	26
2.4.1 Avaliação de novas drogas.....	27
2.4.2 Naftoquinona.....	29
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO.....	33
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
4.1 CULTURA DE CÉLULAS.....	39
4.1.1 Linhagem Celular.....	39
4.1.2 Descongelamento.....	39
4.1.3 Cultivo.....	39
4.1.4 Criopreservação.....	40
4.1.5 Plaqueamento.....	40
4.1.6 Tratamento.....	41
4.2 ENSAIO DE VIABILIDADE METABÓLICA CELULAR.....	41
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de pulmão (CP) está entre os tipos de câncer mais incidentes e letais no mundo todo. *American Cancer Society* estima que em 2013 sejam diagnosticados 228.190 novos casos de CP entre homens e mulheres, e que este será a principal causa de morte relacionada a câncer; somando aproximadamente 159.480 mortes, o que representa mais mortes do que os cânceres de colo, mama e próstata juntos. As chances do desenvolvimento do CP é de 1 em 13 para homens e 1 em 16 para mulheres, sendo que para fumantes o risco se torna ainda maior (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013). No cenário brasileiro o número de novos casos estimados para o biênio 2012/2013 é de 27.000, ficando atrás apenas do câncer de próstata, de mama e de colo do útero (INCa, 2013). No Espírito Santo a estimativa de novos casos para homens e mulheres é de 17,07 e 8,96 por 100 mil habitantes, respectivamente (INCa, 2013). Dados mostram também, que a taxa de sobrevivência em cinco anos (*“five-year survival”*) de pacientes acometidos por CP não ultrapassam os 35% (INCa, 2013).

O grande número de pacientes que não obtêm sucesso com as terapias disponíveis, tem sido explicado, ao menos em parte, pela heterogeneidade da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013). Todavia, os números também refletem a baixa eficácia dos tratamentos disponíveis. O número crescente de medicamentos que entram na fase de ensaio clínico é o reflexo dos avanços na pesquisa para tratamento dos pacientes que são acometidos pelo CP. Sendo assim, produtos naturais e modificações químicas de substâncias antitumorais estão entre as mais importantes estratégias usadas em pesquisas, ganhando destaque como novas drogas antineoplásicas (KUMAGAI, 2012).

Dentre os medicamentos naturais encontram-se as quinonas. Elas pertencem a uma classe de compostos orgânicos, possuindo propriedades químicas que permitem interações com alvos biológicos pela formação de ligações covalentes e como agente transferidor de elétrons em reações de oxidação-redução (KUMAGAI, 2012). Estudos das propriedades antitumorais e mecanismos de ação dos derivados quinônicos têm demonstrado que esses podem atuar como inibidores da topoisomerase via intercalação do DNA e sua toxicidade também pode ser explicada

por estresse oxidativo via geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (WATANABE, 2003). Nessa classe de quinonas, as naftoquinonas são de particular interesse em virtude de sua ocorrência como produtos naturais (PINTO, 2009) e químicos ambientais (EIGUREN-FERNANDEZ, 2008).

As quinonas possuem alta importância farmacológica por possuírem propriedades microbidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores. Indícios apontam que o mecanismo de ação seja através da formação de EROs. De forma parecida, as naftoquinonas podem também agir como antifúngios, anti-inflamatórios, analgésicos e antimaláricos. Dentro do grupo das naftoquinonas, podemos destacar o lapachol (*Tabebuia sp.*) e a lausona (*Lawsonia sp.*) (SILVA et al., 2003). Em relação à lausona, foco deste estudo, essa possui diversas atividades, como: Combate a doenças de pele, sendo mais pronunciado nas doenças que são causadas por fungos; antipirético e, alguns de seus derivados podem combater o vírus HIV 1 (THOMSON, 1971; SILVA et al., 2003). Com base nessas informações, nosso grupo tem desenvolvido projetos que visam à avaliação do efeito citotóxico de derivados inéditos da lausona racionalmente desenhados em linhagem de CP e a relação com a indução de estresse oxidativo como possível modulador do efeito antitumoral dos compostos.

Nesse contexto, dois compostos, que são derivados naftoquinônicos da lausona, foram racionalmente desenhados pelo professor Sandro Greco e colaboradores, no Laboratório de Pesquisas em Química Orgânica, do Departamento de Química, da Universidade Federal do Espírito Santo, e tiveram seu efeito citotóxico avaliado na linhagem celular de CP - H460, conforme medida da viabilidade celular metabólica através do ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (FERRARI, 1990). A estrutura dos derivados naftoquinônicos passou por uma busca em bancos de dados para avaliação do ineditismo das moléculas sintetizadas, ressaltando que os depósitos de patente de ambos os compostos encontram-se em andamento e, por esse motivo, não serão mostradas as estruturas moleculares dos compostos naftoquinônicos, bem como o processo de síntese dos mesmos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O CÂNCER DE PULMÃO: EPIDEMIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

Dados mundiais documentaram 7,6 milhões de mortes causadas por câncer em 2008 (aproximadamente 13% de todas as mortes), sendo os óbitos decorrentes do câncer de pulmão (CP) os mais incidentes dentre todas as formas de malignidades. De fato, houve 1,4 milhões de óbitos ocasionados pela doença, cerca de 18% de todas as mortes relacionadas ao câncer em 2008, contrapondo-se aos 1,6 milhões de novos casos de CP diagnosticados no ano avaliado. Em 2010, a estatística de mortes por CP se agravaram, havendo registro de 1,5 milhões de óbitos causados pela doença (cerca de 19% de todas as mortes decorrentes de câncer em 2010 (revisado em RECK et al., 2013). É alarmante que, não obstante aos avanços vivenciados nas áreas de pesquisa em câncer e de oncologia cirúrgica e clínica, estimativas mundiais apontam para o crescimento dramático de óbitos causados por câncer, tal que são esperadas 13,1 milhões de indivíduos sucumbindo ao câncer em 2013 (aumento de cerca de 72% em relação a 2008). Cumpre informar que 70% das mortes causadas por câncer são registradas em países considerados de receita baixa ou média, dentre os quais está o Brasil. Neste cenário e seguindo a tendência, a incidência mundial de CP tem aumentado em 2% a cada ano (NCI, 2013), reiterando a importância da doença no contexto da saúde pública e privada.

O CP é o terceiro tipo de câncer mais incidente nos Estados Unidos, estando atrás dos cânceres de próstata e de mama (em mulheres) (WHO, 2013). No Brasil, o CP ocupa a quarta posição em incidência, sendo os cânceres de próstata, de mama (feminino) e de colo de útero os mais frequentes, respectivamente (INCa, 2013). Contudo, é o primeiro na causa de morte relacionada ao câncer em ambos os sexos nos Estados Unidos, sendo as estimativas de novos casos e mortes para 2013 de 228.190 e 159.480, respectivamente (NCI, 2013). No Brasil, o CP foi responsável por 20.622 mortes apenas no ano de 2008, ganhando destaque como o tipo de câncer que mais vítimas fez. A incidência do CP é prevalente em idosos e fumantes (90% dos casos). De fato, o CP acomete indivíduos acima dos 65 anos em uma proporção de dois a cada três pacientes e apenas 3% dos casos relatados ocorrem



em pessoas com menos de 45 anos (ACS, 2013). Ademais, a sobrevida média de cinco anos de pacientes com CP varia entre 13% e 21% em países desenvolvidos e entre 7% e 10% nos países em desenvolvimento (INCa, 2013). Vale destacar que, ao contrário do que se observa com cânceres de outras etiologias, a taxa de sobrevida em cinco anos de pacientes com CP permanece relativamente estável em 15%, fato associado, ao menos em parte, às limitações das estratégias vigentes de detecção e tratamento da doença associados à complexidade e heterogeneidade molecular e histológica da mesma (PIKOR *et al.*, 2013; ACS, 2013). O resultado é o diagnóstico tardio do CP, tal que 75% dos novos casos são descobertos como doença local avançada ou metastática (JEMAL *et al.*, 2006).

Diversos fatores de risco têm sido implicados no desenvolvimento do CP, como o histórico familiar, a poluição do ar encontrada nos grandes centros urbanos, e aos ambientes de trabalho como minas, moinhos, fábricas de produtos têxteis, estaleiros, dentre outros, os trabalhadores estão expostos a agentes carcinogênicos, em que pode ser citada a exposição a amianto, gás radão, arsênico, berílio, cádmio, sílica, cloreto de vinil, compostos de níquel e cromo, produtos de carvão, minérios radioativos como urânio, e escape de motores diesel. Também são relacionados indivíduos que se alimentam à base de dietas deficientes em frutas e vegetais, além daqueles que apresentam doença pulmonar obstrutiva crônica para possuírem risco aumentado para o desenvolvimento da doença (ALBERG; SAMET, 2003; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009). Mas, indiscutivelmente, o grande responsável pela alta incidência de CP na população mundial é o tabagismo. Os efeitos devastadores do ato de fumar para a saúde estão bem estabelecidos, mais de 1,1 bilhão de pessoas continuam a fumar e entre 1 e 5% dos fumantes desenvolverá alguma malignidade (JHA *et al.*, 2002).

Histologicamente, o CP é classificado em duas grandes categorias: i) carcinoma de pulmão de pequenas células (SCLC, *small cell lung cancer*) que ocorre em cerca de 15% dos pacientes; ii) e carcinoma de pulmão de não-pequenas células (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) que acomete aproximadamente 85% dos doentes de CP. Por sua vez, NSCLC pode ser dividido em 3 subtipos histológicos principais: i) adenocarcinoma; ii) carcinoma de células escamosas; iii) carcinoma de células grandes. Vale ressaltar que 70% dos casos de NSCLC são dos tipos histológicos

adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas (HANAUSKE *et al.*, 2007), fato que justifica, ao menos parcialmente, a carência de estudos na literatura focados em carcinoma de células grandes, de modo a fazer emergir grande lacuna no nosso conhecimento acerca do subtipo de carcinoma de células grandes de CP. Ainda, muito raramente, é possível que o CP apresente células características de células (SCLC) e células características de NSCLC, sendo então denominado câncer de pequenas células / não-pequenas células combinadas (*combined small cell/non-small cell cancer*) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013). Apesar de compartilharem de características biológicas diversas, os subtipos de CP diferem quanto ao tipo celular de origem, à localização no pulmão e ao padrão de crescimento, sugerindo que são doenças distintas que se desenvolvem a partir de mecanismos moleculares diferentes (Revisado em PIKOR *et al.*, 2013).

Embora todos os subtipos histológicos de CP estejam associados ao fumo de cigarros, o carcinoma de células escamosas e o SCLC, ambos originados predominantemente nas vias respiratórias centrais, são os subtipos de CP mais fortemente correlacionados ao histórico de fumantes. Enquanto o carcinoma de células escamosas se origina de células basais localizadas nas vias aéreas centrais, o adenocarcinoma surge no epitélio glandular do parênquima pulmonar de pneumócitos do tipo II ou de células claras (TRAVIS *et al.*, 2011). Interessantemente, as últimas décadas foram marcadas por alterações significativas na tendência global de incidência de tipos histológicos de CP, havendo declínio nos registros de casos de SCLC e carcinoma de células escamosas. Como consequência, o adenocarcinoma de pulmão é hoje a forma prevalente de CP (cerca de 50% de todos os casos da doença). O fenômeno tem sido atribuído às modificações na composição dos cigarros com menos alcatrão e nicotina que antes, aumentando a o número de cigarros consumidos por fumantes, os quais inalam mais fumaça. Assim, agentes carcinogênicos do tabaco se depositam predominantemente na periferia pulmonar, sítio predominante de origem de adenocarcinoma de pulmão (Revisado em PIKOR *et al.*, 2013).

Observações clínicas de pacientes com adenocarcinoma revelaram que a doença pode metastizar rapidamente para o fígado, glândulas adrenais, ossos ou cérebro (Revisado em WALKER, 2008). Em contraste, o prognóstico de pacientes com de

adenocarcinoma tende a ser pior em relação a indivíduos que são diagnosticados com outros subtipos de CP (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009). O carcinoma bronquioalveolar é uma forma de adenocarcinoma que se apresenta tipicamente com um padrão inflamatório multifocal (Revisado em WALKER, 2008), além de comumente associado a um histórico de tabagismo (NCI, 2013; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013). Tende a ser encontrado na região central dos pulmões, próximo aos brônquios, resultando frequentemente em obstrução endobronquial e hemoptise (Revisado em WALKER, 2008). Já o carcinoma de células grandes pode surgir em qualquer parte do pulmão, além de crescer e propagar-se rapidamente, dificultando o sucesso do tratamento. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013). Com a identificação e classificação do tipo celular para cada tipo de desenvolvimento do CP é possível, de certo modo, avaliar qual o provável desenvolvimento e resposta ao tratamento dessa malignidade para cada paciente, para a identificação e classificação dos subgrupos a análise é feita pelo tamanho, pelo formato e pela composição química quando as células são observadas ao microscópio. O motivo pelo qual as células, mesmo havendo distinção entre elas, são agrupadas em único grupo é pelo fato de serem tratadas da mesma maneira e por terem um prognóstico comumente muito similar (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

## 2.2 ESTADIAMENTO DE NSCLC

O NSCLC apresenta estadiamento segundo o sistema TNM do “*American Joint Committee on cancer*” (AJCC) (TABELAS 1 e 2), que considera o tamanho e localização do tumor primário (T), o envolvimento de linfonodos (N), e a presença de metástase distante (M). Aproximadamente 75% dos casos de NSCLC nos Estados Unidos são diagnosticados com doença regional ou metastática, ao passo que menos de 20% são consideradas localizadas no momento do diagnóstico (NCI, 2008). A taxa de sobrevida em cinco anos sofre uma redução de 56% em pacientes com estágio I para aproximadamente 2% no estágio IV, o mais avançado da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009). O estadiamento tardio do CP afeta negativamente os resultados da terapia, ao passo que um estadiamento inicial da doença proporciona a determinação da extensão do CP de forma correta, uma eficaz estratificação prognóstica, bem como a seleção do tratamento mais

apropriado. Dessa forma fica clara a importância do estadiamento preciso na condução do tratamento e obtenção do sucesso terapêutico.

---

### ESTADIAMENTO TNM

TUMOR	DESCRIÇÃO
TX	O tumor primário não pode ser avaliado ou é detectada a presença de células malignas em escarro ou lavado bronquial, mas o tumor não pode ser visualizado por imagem ou broncoscopia.
T0	Não há evidências de tumor primário.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor com 3 cm ou menos em maior dimensão, rodeado por pulmão ou pleura visceral, sem evidência broncoscópica de invasão mais proximal do que o brônquio lobar.
T2	Tumor com quaisquer dessas características de tamanho ou extensão: mais que 3 cm na maior dimensão; envolvimento do brônquio principal, 2 cm ou mais distal da carina; e invade a pleura visceral. Associado com atelectasia ou pneumonite obstrutiva que se estende à região hilar, mas não envolve o pulmão inteiramente.
T3	Tumor de qualquer tamanho que invada diretamente: parede torácica, diafragma, pleura mediastinal, pericárdio parietal; ou tumor no brônquio principal menor que 2 cm distal à carina, mas sem envolvimento da carina; ou atelectasia associada ou pneumonite obstrutiva de todo o pulmão.
T4	Tumor de qualquer tamanho que invada: mediastino, coração, grandes vasos, traquéia, esôfago, coluna vertebral, carina; ou nódulos tumorais separados no mesmo lobo; ou tumor com efusão pleural maligna.

---

LINFONODOS REGIONAIS	DESCRIÇÃO
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Não há metástase nos linfonodos regionais.
N1	Metástase no peritórax ipsilateral e/ou linfonodo hilar ipsilateral, e nódulos intrapulmonares incluindo envolvimento por extensão direta do tumor primário.
N2	Metástase no mediastino ipsilateral, hilar contralateral, escaleno contralateral ou ipsilateral, ou linfonodos supraclaviculares.
METÁSTASE DISTANTE	DESCRIÇÃO
MX	Metástase distante não pode ser avaliada.
M0	Não há metástase distante.
M1	Presença de metástase distante.

TABELA 1 - Definição do sistema de estadiamento TNM

Fonte: AJCC Cancer Staging Handbook (6 ed., p.197)

Nota: Tradução nossa.

ESTADIAMENTO			
ESTÁGIO	TUMOR	NÓDULO	METÁSTASE
Carcinoma oculto	TX	N0	M0
Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio IA	T1	N0	M0
Estágio IB	T2	N0	M0
Estágio IIA	T1	N1	M0
Estágio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estágio IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Estágio IIIB	Qualquer T	N3	M0
	T4	Qualquer N	M0
Estágio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

TABELA 2 - Estadiamento do câncer de pulmão

Fonte: AJCC Cancer Staging Handbook (6 ed., p.198)

### 2.3 TRATAMENTO DO CP

O tratamento mais eficaz disponível atualmente para NSCLC ainda é a ressecção cirúrgica, entretanto, mais de 70% dos pacientes possuem doença avançada com metástases nodais e/ou viscerais no momento do diagnóstico, o que impossibilita a ressecção (Revisado em LANTUÉJOUL *et al.*, 2009). Assim sendo, para que a taxa de sobrevida de pacientes com CP aumente, faz-se necessário uma melhor estratégia para o tratamento dos diferentes tipos de CP, buscando identificar os melhores agentes para cada situação, aumentando a eficácia do tratamento. Assim possibilitar um tratamento individualizado e com eficácia elevada.

As estratégias quimioterápicas para o CP têm evoluído consideravelmente nos últimos tempos, com a finalidade de se alcançar melhora no prognóstico da doença

e, principalmente, a qualidade de vida dos pacientes que são portadores dessa malignidade.

A quimioterapia tem como objetivo parar o crescimento das células cancerosas, por meio de morte celular ou por parada do ciclo celular. Importante diferenciar a quimioterapia sistêmica (Quando o quimioterápico é ingerido ou injetado em veias ou músculos e alcança as células cancerosas através da corrente sanguínea) e a quimioterapia regional (Quando o quimioterápico é aplicado diretamente no fluído cerebrospinal, um órgão ou uma cavidade do corpo, dessa forma tendo efeito nas células da região aplicada). A maneira como a quimioterapia é administrada depende do tipo ou estágio do câncer no início do tratamento (NCI, 2013).

As opções de tratamento para o CP - NSCLC são traçadas de acordo com o estágio de desenvolvimento:

- Para o Estágio de carcinoma de pulmão de não-pequenas células ocultas: É encontrado normalmente em estágios iniciais, onde o tumor está apenas no pulmão, é curado por cirurgia apenas, na maioria dos casos.
- Para o Estágio 0, também chamado de carcinoma *in situ*: Tem como tratamento, além do tratamento cirúrgico, terapia fotodinâmica, cirurgia a laser e criocirurgia.
- Para o Estágio I: Tem como tratamento a cirurgia, a radioterapia externa (para pacientes incapazes de fazer cirurgia ou que escolheram não fazer a cirurgia), ensaio clínico de quimioterápicos ou radioterapia seguido de cirurgia, ensaio clínico de cirúrgica seguido por quimioprevenção e ensaio clínico de tratamento dado através endoscopia, como a terapia fotodinâmica.
- Para o Estágio II: Tem como tratamento cirurgia, quimioterapia seguido de cirurgia, cirurgia seguido por quimioterapia, radioterapia externa

(Pacientes que não podem fazer a cirurgia ou optaram por não fazer a cirurgia) e ensaio clínico de radioterapia seguido de cirurgia.

- Para o Estágio IIIA - NSCLC
  - Do tipo que pode ser removido cirurgicamente: É tratado com cirurgia seguida por quimioterapia, quimioterapia seguido de cirurgia, cirurgia seguido por quimioterapia combinado com radiação, cirurgia seguida por terapia com radiação e ensaio clínico de novas combinações de tratamentos.
  - Do tipo que não pode ser removido cirurgicamente: É tratado com quimioterapia e radiação, dado como tratamentos separados no mesmo período de tempo, apenas radioterapia externa (pacientes impossibilitados de utilizarem terapia combinada) como tratamento paliativo para aliviar sintomas e melhorar a qualidade de vida, radioterapia interna ou cirurgia a laser, também como tratamento paliativo para aliviar sintomas e melhorar a qualidade de vida e ensaio clínico de novas combinações de tratamentos.
- Para o Estágio IIIB: São tratados com quimioterapia seguido por radioterapia externa, quimioterapia e radioterapia dados como tratamentos separados no mesmo período de tempo, quimioterapia seguido de cirurgia, radioterapia externa sozinha para pacientes que não podem ser tratados com quimioterapia, radioterapia interna ou externa como terapia paliativa, para aliviar a dor e outros sintomas e melhorar a qualidade de vida e ensaio clínico de novos esquemas de radioterapia e novas combinações de tratamentos.
- Para o Estágio IV: Tem como tratamento a combinação de quimioterapia, manutenção da terapia com droga anticâncer para impedir a progressão tumoral, após a combinação de quimioterapia, combinação de quimioterapia e terapia alvo com anticorpo monoclonal,



terapia alvo com inibidor da tirosina quinase, radioterapia externa como terapia paliativa, para aliviar dor e outros sintomas e melhorar a qualidade de vida, terapia a laser e/ou radioterapia interna e ensaio clínico de novas drogas e combinações de tratamentos (NCI, 2013).

A terapia padrão em câncer NSCLC é exclusivamente baseada no uso de compostos citotóxicos, como compostos a base de cisplatina. Para que esse quadro seja alterado é necessário que haja um maior entendimento dos mecanismos que alcancem a quimio-sensibilidade, pois dessa forma é possível administrar um tratamento personalizado ao paciente. Uma vez que a cisplatina é o composto mais antigo com eficácia na terapia adjuvante, muitos trabalhos têm focado nos alvos moleculares que geram a eficácia da cisplatina. Um novo composto que consiga acessar, especificamente, a ativação das vias de reparo do DNA, mais do que alcançar um único gene ou proteína, parece ser a opção promissora para ser testada no tratamento do CP.

A terapia personalizada consiste em três componentes essenciais: presença de um oncogene alvo que está envolvido no crescimento tumoral; biomarcadores de diagnóstico disponíveis para detectar a presença do alvo; e um ensaio clínico bem conduzida para confirmar a eficiência do tratamento (MOK, 2011). Tem sido levado em conta por médicos e pesquisadores, que existem diferenças significantes entre os pacientes acometidos com diferentes tipos de CP, tanto no que diz respeito às diferentes subclasses, quanto à variabilidade, ou heterogeneidade, genética encontrada entre os tumores. Em 1987, para a classificação do CP, analisava-se apenas mutações no gene *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS) (PAO, 2011). Contudo, hoje, são identificados, em mais da metade dos casos de CP, mutações no KRAS, no gene que codifica o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR), ou em outro gene ou em combinações de genes (KRIS, 2011). Ainda sobre a identificação de biomarcadores, atualmente é preconizado que esses estão restritos à histologia em particular, como por exemplo, no caso dos genes do EGFR e EML4-ALK que quase sempre são identificados em adenocarcinomas, enquanto que há identificação de alterações no gene do fator de crescimento de fibroblasto em carcinoma de célula escamosa.

Até o final dos anos 90, o tratamento para CP avançado era baseado apenas em terapia combinada com platina, independentemente do subtipo histológico, e, mais agravante, sem outras opções para o tratamento (RECK *et al.*, 2013). Com a introdução das novas drogas, também chamadas de drogas citotóxicas de terceira geração, como por exemplo, gemcitabine, vinorelbine, docetaxel e plactaxel, o tratamento do CP do tipo NSCLC mudou, e como consequência houve um aumento na sobrevida global, em torno de 8 meses (SCHILER *et al.*, 2002). No ano de 2002, foi constatado que o platô de eficiência havia sido alcançado no tratamento do CP – NSCLC, o qual não podia mais se obter melhores resultados com as drogas quimioterápicas utilizadas. No entanto, a partir de então, a sobrevida global tem melhorado para uma média de sobrevida de 12 meses, às vezes até mais, em estudos de ensaios clínicos (SANDLER, 2006). Essa melhoria só foi possibilitada graças ao reconhecimento de que os diferentes subtipos histológicos e as mutações determinam a biologia dessa malignidade e prediz a eficiência da droga (SCAGLIOTTI *et al.*, 2008).

Esse impulso para a descoberta de novas drogas proporcionou que, na última década, o número de ensaios clínicos explorando tratamentos em diferentes perfis moleculares do CP aumentasse exponencialmente. Em 2013 mais de 800 triagens examinaram o papel do perfil molecular no tratamento do CP (CLINICAL TRIALS.GOV, 2013). Nesse contexto, são então geradas novas drogas alvos para o tratamento de pacientes com NSCLC, dentro desse grupo podemos citar: o bevacizumab, que tem como alvo o VEGF, através de anticorpos; o erlotinib e gefitinib, ambos tendo como alvo as mutações ativas em EGFR, tendo como mecanismo de ação a inibição da EGFR tirosina quinase; e o crizotinib que irá ter como alvo o rearranjo em ALK, através da inibição da ALK tirosina quinase. Ademais, outros tipos de tratamento estão disponíveis para pacientes com CP do tipo NSCLC. Alguns tratamentos padrões, e alguns outros estão começando seus testes em ensaios clínicos. Atualmente, segundo a NCI - *National Cancer Institute* - (2013), existem nove tipos de tratamentos considerados padrões. Ademais, para os casos de CP em que o tratamento de escolha é a quimioterapia, o *food and Drug Administration* (FDA) disponibiliza uma lista com todas as drogas aprovadas para o tratamento do CP do tipo NSCLC, essa lista inclui nomes genéricos e até mesmo combinações de drogas. Podemos citar como exemplos pertencentes à lista: Avastin

(Bevacizumab), Carboplatina, Cisplatina, Crizotinib, Erlotinib, Gefitinib, Paclitaxel, Carboplatina-Taxol, Gemcitabina-Cisplatina.

A adequada seleção de pacientes, a identificação do perfil característico do CP, associado ao desenvolvimento de novas drogas com atividade altamente específica para o CP tem ganhado lugar de destaque nas pesquisas e proporcionado um melhor prognóstico para pacientes acometidos por essa malignidade. E por causa desse desenvolvimento, vários desafios e oportunidades têm se tornado aparentes. Um dos desafios é o acompanhamento de pacientes portadores de alterações oncogênicas específicas e que desenvolveram resistência após tratamento, como por exemplo, com inibidores de EGFR e ALK tirosina quinase. A aquisição da resistência para inibidores da EGFR tirosina quinase é definida clinicamente (FELIP *et al.*, 2011), onde são dados alguns mecanismos de aquisição à resistência. Em um dos estudos foi observado que o gene alvo também sofre uma segunda mutação ou amplificação, resultando em uma ineficiente ligação do inibidor tirosina quinase ao alvo, um exemplo é a mutação Thr90Met no gene do EGRF (SHAW; ENGELMAN, 2013). Apesar do fato de não haver conceitos terapêuticos ainda estabelecidos para vencer a resistência após o tratamento com inibidores de EGFR tirosina quinase, muitas alterações, que estão relacionadas com a resistência, são passíveis de serem alcançadas através de novos compostos, e assim sendo, estão sendo testados novos compostos nos ensaios clínicos. Ademais, quase todos os pacientes com um rearranjo em ALK tratados com crizotinib desenvolvem resistência após meses ou anos e resultados iniciais sugerem que modificações mediadas pela resistência adquirida no gene ALK também possui perspectivas terapêuticas promissoras (DOEBELE, 2012). Sendo assim, torna-se imperativo a busca por novos agentes terapêuticos a fim de se alcançar melhores resultados em pacientes que desenvolveram resistência aos quimioterápicos disponíveis, mantendo sempre a especificidade e alto poder citotóxico apenas para as células de câncer.

Dentre os estudos de perfis específicos para o CP, no intuito de se encontrar novos agente terapêuticos com novos biomarcadores, há os estudos voltados para o microambiente tumoral, com enfoque especial nas EROs, que buscam a elucidação do seu papel no desbalanço redox, relacionado ao papel da sobrevivência ou morte celular em células de câncer em específico. Já é conhecido que fenômenos

fisiopatológicos são modulados a partir dos níveis de EROs, como, por exemplo, a proliferação e a migração, que são primordiais para o desenvolvimento da doença (DENG, 2013; TYAGI, 2013); todavia não se sabe ao certo como o estresse oxidativo pode afetar o desenvolvimento do CP e o entendimento de que sua presença no microambiente tumoral promove morte ou sobrevivência das células malignas ainda é controverso.

Nesse intuito de gerar uma nova linha de tratamento, que se diferencie das outras já estabelecidas por sua maneira de atuação no CP, nosso grupo iniciou pesquisas no que tange o desenvolvimento de um composto novo, de origem natural, que seja capaz de combater o CP. Focamos nas espécies reativas de oxigênio, por já estarem presente no microambiente tumoral, através do estresse oxidativo, e por achados na literatura que apontam que compostos naftoquinônicos têm seu efeito antitumoral devido à formação de espécies reativas de oxigênio também (VALKO, 2007, SILVA *et al.*, 2003).

## 2.4 QUIMIOTERÁPICOS NATURAIS

Os quimioterápicos Etoposídeo, Vincristina, Vimblastina, Tenoposídeo e Taxol foram introduzidos ao longo dos últimos vinte anos no tratamento do câncer, isso corrobora para o grande interesse que existe por parte das indústrias farmacêuticas na produção de produtos que tenham a sua origem naturalmente (VIEGAS; BOLZANI, 2006).

Em meados dos anos 60, a Camptotecina foi isolada de uma árvore chinesa, *Camptotheca acuminata*, e anos mais tarde mostrou sua atividade citotóxica através da inibição da topoisomerase I. Todavia, por apresentar baixos níveis de solubilidade acabou não sendo utilizada pela indústria farmacêutica. A partir desse ponto, originaram-se análogos da Camptotecina (Ex. Topotecan), esse por sua vez eram mais solúveis em água, e acabaram sendo aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do câncer de cólon e ovário (VIEGAS; BOLZANI, 2006).

O Taxol, que foi descoberto em 1966, obteve uma atividade citotóxica em *in vitro*, não obstante, por apresentar estrutura complexa e grande dificuldade de ser encontrado em fontes naturais (10 toneladas de casca de *Taxus brevifolia*: 1 Kg Taxol), teve por interrompido a sua utilização. Após mais ou menos 15 anos depois, houve o descobrimento de outros taxanos, dessa vez apresentando concentração e rendimento superiores ao do Taxol. No ano de 1988, foi proposto uma rota semi-sintética para o Taxol, que foi suplantada em 1994 por outra rota também semi-sintética mais eficiente (VIEGAS; BOLZANI, 2006).

No presente momento, a procura por novos agentes antitumorais tem se tornado cada vez mais necessária visando sua maior eficácia e menor efeito citotóxico às células normais. Na última década, quimioterápicos derivados de bactérias (Adriamicina), plantas (Lapachol, Taxol), organismos e microorganismos marinhos, entre outros, têm ganhado destaque por apresentarem bons resultados nos ensaios realizados nas pesquisas (SUBRAMANIAN *et al.*, 2006). O tratamento de várias doenças utilizando como base produtos naturais é observado há muitos anos, muito corriqueiramente na ocorrência da chamada “medicina popular”. Partir da cultura de encontrar na natureza, principalmente a partir de plantas, o tratamento do câncer tornou-se rotineiro, prova disso são os números que apontam que aproximadamente 62% de drogas comercializadas para o tratamento do câncer entre 1983 e 1994 serem de origem natural (RAVELO *et al.*, 2004).

#### 2.4.1 AVALIAÇÃO DE NOVAS DROGAS

Pesquisas que se voltam para a avaliação de novas drogas tornou-se um ponto importante para alcançar o objetivo de se obter um melhor resultado com a utilização da terapia, resultando na cura de doenças que podem ser fatais ao paciente acometido.

O primeiro passo para iniciar o estudo é a extração ou, como no caso dos nossos compostos do presente trabalho, a síntese de uma molécula da nova droga. Em se tratando de síntese, a identificação desta nova droga é feita a partir de uma modificação química de uma molécula já conhecida. Na próxima etapa, a atividade e

seletividade da droga são feita através de uma triagem que se utiliza de ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*, a partir dos resultados obtidos é possível traçar um perfil farmacológico e comparar a compostos de referência para averiguar sua atividade (Revisado por ARÊAS, 2007).

A avaliação de novos medicamentos para seres humanos deve levar em consideração alguns fatores que têm grandes chances de interferir no estudo que se está desenvolvendo: i) Oscilação da gravidade de uma doença (Exacerbações e remissões); ii) a presença de outras doenças que poderiam influenciar a avaliação e iii) tendência dos pacientes a responder positivamente a um tratamento (resposta ao tratamento com placebo) (KATZUNG, 2003).

O estudo clínico é subdividido em quatro fases. Na primeira fase, são selecionados voluntários sadios, são comparadas as respostas em animais e seres humanos, estabelecidos os limites prováveis de faixa posológica segura e determinados a absorção, meia-vida e metabolismo. Quando o estudo encontra-se na fase dois, o grupo é menor, porém agora sendo portadores da doença-alvo, dessa forma é avaliado, de forma mais aprofundada as toxicidades. Na fase três, o estudo poderá abranger milhares de pacientes, possibilitando o melhor estabelecimento da segurança e eficácia da droga. A partir da quarta e última fase, desde que haja autorização por parte do órgão responsável, pode-se comercializar a nova droga, sendo implantado o serviço para monitoramento, o que caracteriza a fase quatro. Para casos específicos de agentes antineoplásicos que apresentam atividade potencial e que não exibem toxicidade excessiva, são realizados os estudos de fase I em pacientes com câncer avançado e as etapas posteriores são na maioria das vezes aceleradas (KATZUNG, 2003).

Como um dos grandes órgãos internacionais de grande relevância para o teste de novas moléculas com potencial atividade antitumoral tem-se o Programa de Desenvolvimento Terapêutico (DTP) do *National Cancer Institute* (NCI), o qual realiza tanto testes *in vitro*, como também *in vivo*, no intuito de identificar e avaliar novas drogas e mecanismos de ação (NCI, 2013). Este serviço foi implementado em Abril de 1990, e vem testando compostos com atividades antitumorais desde então, utilizando-se de um painel de 59 células tumorais *in vitro* formado de nove

tipos de cânceres, listados em leucemia, melanoma, câncer de pulmão, cólon, cérebro, ovário, mama, próstata e fígado. O maior enfoque fica para os compostos sintéticos e naturais que mostram uma inibição do crescimento celular ou morte em linhagens de células tumorais, desses é feito um estudo mais aprofundado (SHOEMAKER, 2006).

No início da triagem, os ensaios são divididos em duas partes, a primeira que irá avaliar todos os potenciais compostos utilizando o painel de linhagens celulares em uma dose única ( $10^{-5}$  M). Selecionando aqueles compostos que exibiram inibição do crescimento de forma significativa, esses são avaliados contra células do painel em cinco concentrações diferentes (SHOEMAKER, 2006).

#### 2.4.2 NAFTOQUINONA

As quinona fazem parte de uma classe de compostos orgânicos que são derivados a partir de compostos aromáticos, como benzeno e naftaleno, por conversão de um número par de grupos  $-\text{CH}=\text{}$  em grupos  $-\text{C}(=\text{O})$  com qualquer rearranjo necessário das duplas ligações, resultando em uma estrutura diona totalmente conjugada (IUPAC, 1997). Essas têm propriedades químicas que as permitem interação com alvos biológicos, por ligações covalentes e por agir como agente transferidor de elétrons em reações de oxidação-redução (BOLTON, 2000; CADENAS, 1992; MONKS, 2002; O'BRIEN, 1991; PENNING, 1999; PINTO, 2009). Basicamente, a nomenclatura das quinonas se dá com o prefixo que indica o hidrocarboneto aromático precursor ("benzo-" precursor benzeno; "nafto-" precursor naftaleno; "antra-" precursor antraceno e etc.) e o sufixo "-quinona". Há um grande interesse por essa classe porque os produtos são encontrados naturalmente (PINTO, 2009; SHEARER, 2008).

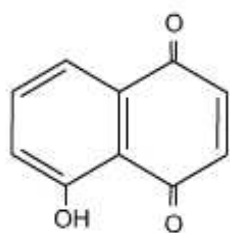
As quinonas constituem uma classe de produtos naturais de ampla distribuição, ocorrendo desde os vegetais superiores até bactérias, fungos, equinodermos e alguns artrópodes (THOMSON, 1971). Além da sua importância em diversos processos bioquímicos vitais, as quinonas têm sido alvo de diversos estudos

farmacológicos devido à grande biodinamicidade que apresentam, destacando-se as propriedades microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas de reparo celular (SILVA *et al.*, 2003).

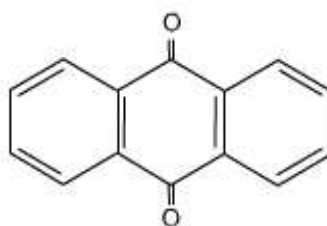
A porção quinônica é considerada pela NCI um importante modelo biológico, pois a partir desse é possível o desenvolvimento de novos compostos bioativos com bons níveis de citotoxicidade (LIU

, 2004). Isso pode ser visto pelo número de drogas antitumorais utilizadas na clínica contendo a porção quinônica, como as antraciclina que mostraram excelentes resultados (AVENDAÑO, 2008).

NAFTOQUINONA



ANTRAQUINONA



BENZOQUINONA

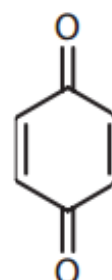


Figura 1 – Estrutura dos diferentes derivados quinônicos.

Fonte: Adaptado de Kumagai, Y et al. The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. Annual Reviews Pharmacology Toxicology. 2012.

Dentro do grande grupo das quinonas, é encontrado o subgrupo das naftoquinonas. Essas também continuam possuindo as características de interação biológica como antifúngica, anti-inflamatória, analgésica e antimalárica. Um número considerável de estudos têm demonstrado a ação de naftoquinonas, como o Lapachol (*Tabebuia SP*) e a Lausona (*Lawsonia sp*) (FIGURA 4). A  $\beta$ Lapachona, uma orto-naftoquinona, tem sido amplamente estudada principalmente por apresentar efeitos seletivos em linhagens tumorais quando comparados a linhagens normais. Vários mecanismos de ação das naftoquinonas se apresentam de forma dose e tempo-dependente. A



inibição do crescimento celular observada, pode ser associada à indução da apoptose, inibição da topoisomerase II ou estresse oxidativo, entre outros mais (CHOI *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003; KONGKATHIP *et al.*, 200; LI *et al.*, 2003; WOO & CHOI, 2005; REINICKE *et al.*, 2005).

Foram associados às naftoquinonas resultados que descrevem uma redução significativa do crescimento celular em linhagens tumorais quando conjugadas a outros agentes, como o Tiosemicarbazone (NTQS) e seus complexos formados com metais. A citotoxicidade do NTQS associada ao cobre, como exemplo, mostrou ser maior do que ao Etoposídeo, que é um quimioterápico usado na clínica (CHEN *et al.*, 2004). Os dois compostos que irão ser utilizados no presente trabalho são derivados da lausona, que também se destaca, juntamente com o lapachol e seus diversos derivados, como potencial agente antineoplásico (Revisado por ARÊAS, 2007).

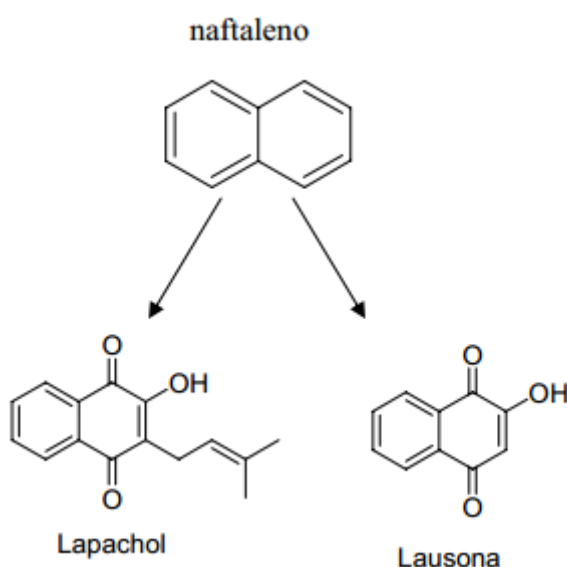


Figura 2 – Estrutura dos derivados do naftaleno (Lapachol e Lausona).

Fonte: Adaptado de Silva M. N., Ferreira V. F., Souza M. C. B. V. Na overview of the chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on  $\beta$ -lapachone and derivatives. Química Nova 2003; (26): 407:416

A Lausona (2-Hidroxi-1,4-naphthoquinona), utilizada como base para síntese dos compostos inéditos naftoquinônicos do presente trabalho, é um pigmento obtido naturalmente das folhas da hena (*Lawsonia alba*, *Lythraceae*) e uma das

naftoquinonas estruturalmente mais simples, mesmo assim com várias propriedades biológicas, incluindo atividade antitumoral (GOKHALE, 2000). A atividade antitumoral dos compostos naftoquinônicos está sempre associado à flavoenzima NAD(P)H:quinona oxiredutase (NQO1, DT-diaphorase, E<sup>+</sup>C<sup>+</sup>1.6.99.2). NQO1 é uma enzima envolvida na desintoxicação e ativação de uma variedade de substratos, a propriedade de catalizar a redução de dois elétrons é considerada como quimioprotetora, pois, reduz compostos quinônicos exógenos, transformando-os em sua forma hidroquinona correspondente, utilizando o H<sup>+</sup> a partir do NADH ou NADPH (BOOTHMAN *et al.*, 1993; TRUSH *et al.*, 1996; PINK *et al.*, 2000; PLACHON *et al.*, 2001; TAGLIARINO *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2006; BEY *et al.*, 2007; CHOI *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2008), com isso evita a produção de radicais livres semiquinônicos e subsequentemente a redução do estresse oxidativo, além de também estar envolvido com o metabolismo da vitamina E, catalizando a produção de um metabólito antioxidante da vitamina E, hidroquinona vitamina E (SIEGEL *et al.*, 1997). Curiosamente é visto que há associação entre o polimorfismo de NQO1 e o risco de câncer de pulmão (ROSVOLD *et al.*, 1995; WIENCKE *et al.*, 1997; HAMAJIMA *et al.*, 2002), o qual pode ser associado ao aumento do estresse oxidativo.

E partir desses dados da literatura, os derivados naftoquinônicos da Lausona, denominados PIC20 e PIC21, foram alvo de estudo para nosso grupo em colaboração com o professor Sandro Greco do Laboratório de Pesquisas em Química Orgânica - Departamento de Química - Universidade Federal do Espírito Santo.

Após o desenvolvimento de rotas sintéticas para formação de compostos inéditos a partir do Lausona e comprovação do alto rendimento na produção dos compostos, coube como próxima etapa a avaliação do efeito citotóxico antitumoral para algumas linhagens de câncer humano. Dentre as linhagens, este trabalho se desenvolveu para elucidar os efeitos induzidos pelos compostos em linhagens celulares de pulmão e testificar que o desenvolvimento desses novos compostos é de grande importância no desenvolvimento de mecanismos no combate do câncer de pulmão, bem como iniciar a busca pelo entendimento no que diz respeito às espécies reativas de oxigênio geradas.

## 2.5 ESTRESSE OXIDATIVO

O sistema redox é essencial para manutenção da homeostase celular. Sob condições fisiológicas, as células mantêm o balanço redox através da geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. As EROs incluem espécies radicais, tais como o superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxil ( $HO^\bullet$ ), juntamente com espécies não radicalares, tal como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Todos eles são derivados do oxigênio, sendo que a redução do oxigênio é o principal mecanismo de formação de EROs (KAMATA, 1999). Conforme ilustrado na FIGURA 1, o produto inicial, superóxido, resulta da adição de um único elétron à molécula de oxigênio. Em sequência, o superóxido pode ser rapidamente dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD) ou sofrer reação de forma espontânea. Em ambos os casos há a formação do peróxido de hidrogênio e oxigênio, sendo que o oxigênio pode ser reutilizado para geração de novos radicais superóxido. Na presença de metais de transição reduzidos, através da reação de Fenton, o peróxido de hidrogênio pode ser convertido em radical hidroxil altamente reativo (DROGE, 2002).

Conforme Halliwell (1999), o oxigênio ( $O_2$ ) é metabolizado em nosso organismo, distribuindo-se da seguinte maneira: 85 a 90%, aproximadamente, são utilizados pela mitocôndria, através da cadeia de transporte de elétrons, e o restante, de 10 a 15%, são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e também por reações químicas de oxidação diretas. Na parte terminal da cadeia de transporte de elétrons, a enzima citocromo oxidase remove um elétron de cada uma das quatro moléculas de citocromo c e adiciona os quatro elétrons ao oxigênio para formar água (em torno de 95 a 98% dos 85 a 90% supracitado). Os 2 a 5% restantes são reduzidos univalentemente em metabólitos de EROs.

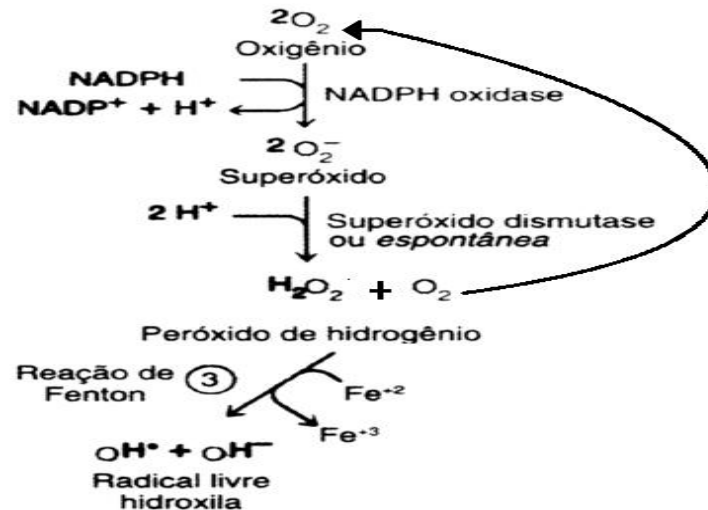


Figura 3 – Esquema da produção das espécies reativas de oxigênio.

Fonte: Adaptado de Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*82: 47–95, 2002.

O oxigênio, em razão da sua configuração eletrônica, está ávido a receber um elétron de cada vez. A conversão univalente do oxigênio à água processa-se da seguinte maneira:

a) A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera a formação do radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ )

b) O superóxido ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio forma peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), através do processo chamado dismutação (PAL, 1994). Essa reação é catalisada pela SOD que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos e que acelera a reação a  $10^4$  vezes a frequência para dismutação espontânea em um pH fisiológico.

c) Quando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxil ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), o mais reativo intermediário, uma vez que tem capacidade de reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima e assim influenciar enzimas, membranas ou ácidos nucleicos (JENKINS, 1988). O radical hidroxil pode ser formado quando o peróxido de hidrogênio reage com íons ferro ou cobre, reação conhecida como Reação de Fenton.

Os íons de metais de transição podem também catalisar a reação entre peróxido de hidrogênio e superóxido, conduzindo à produção de radical hidroxil, chamada Reação de Haber-Weiss.

Esses metabólitos do oxigênio, denominados EROs, são assim denominados devido ao seu grande poder de reatividade com biomoléculas e, em geral, alteram o tamanho e a forma dos compostos com os quais eles interagem (SCHNEIDER, 2004).

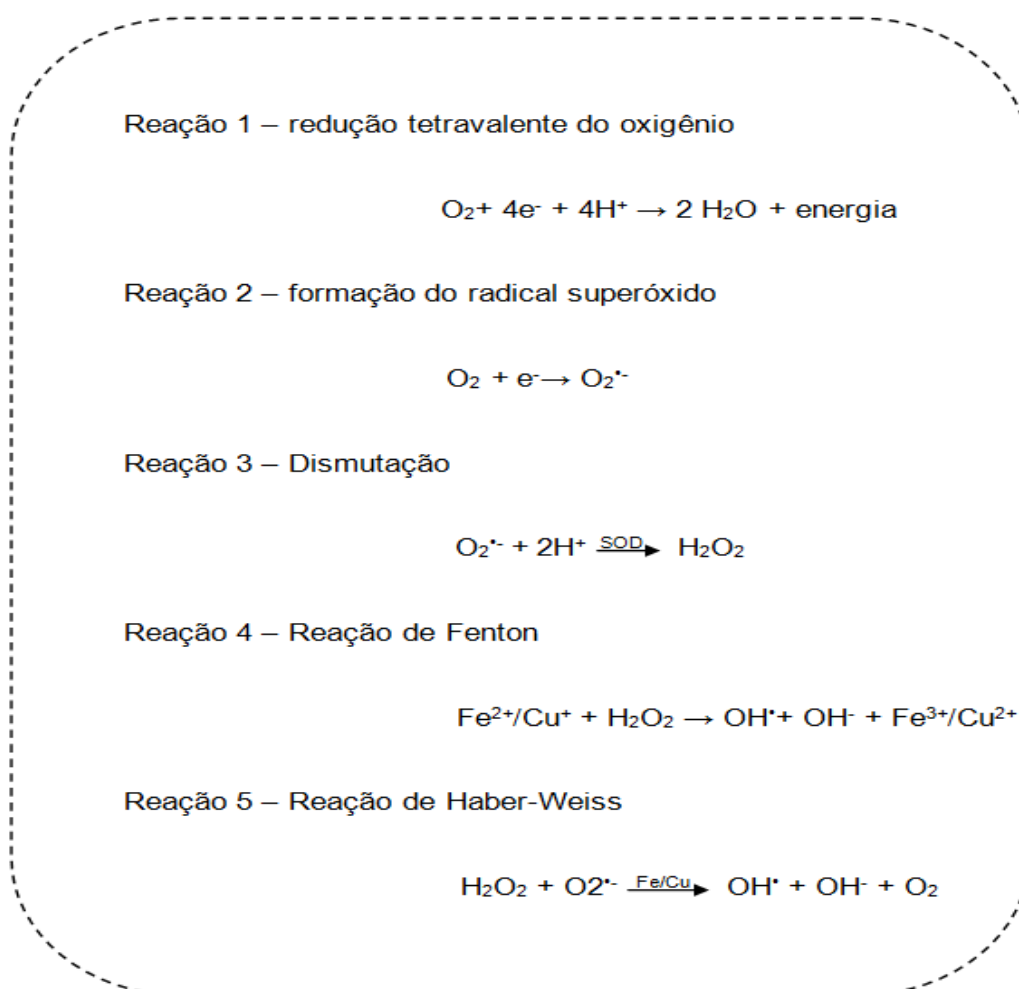


Figura 4 – Esquema das reações que ocorrem para formação de radicais livres.

Fonte: Adaptado de Halliwell B, Gutteridge, JMC. Free radicals in biology and medicine. 3 ed. New York: Oxford, 1999.

O termo estresse oxidativo (EO) é dado quando se observa, a partir de radicais livres, danos teciduais ou produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos. O organismo entra em estado de EO quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas prooxidantes e antioxidantes, de maneira que os prooxidantes encontram-se superiores aos níveis dos antioxidantes (SIES, 1986). Um dos principais mecanismos de lesão que o tecido sofre com o desbalanço redox é a lipoperoxidação (LPO), em outras palavras, ocorre oxidação da camada lipídica da membrana celular. Ademais, o EO pode gerar danos às proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função celular e, sendo assim, tecidual (SCHNEIDER, 2004). A fim de minimizar o EO, o ambiente intracelular contém vários sistemas antioxidantes, tais como as enzimas glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase, que através de reações químicas neutralizam as EROs, contribuindo para prevenção do EO (FILHO, 2009).

O aumento da produção de EROs ou a diminuição da capacidade dos sequestrantes de EROs devido a estímulos exógenos ou alterações metabólicas endógenas podem romper com a homeostase redox, levando a um aumento acentuado dos níveis de EROs intracelular (TRACHOOTHAM, 2008). O aumento do EO apresenta um papel crucial em uma variedade de condições patológicas incluindo câncer, doenças neurodegenerativas e angina (VALKO, 2007). Em condições fisiológicas, o DNA celular é constantemente atacado por EROs, tem sido estimado que em células de mamíferos são encontrados, aproximadamente,  $1,5 \times 10^5$  células que sofreram danos no DNA por EROs (BECKMAN, 2007). Por conseguinte, os ataques podem induzir mutações e desempenhar um papel no processo evolutivo, uma vez que níveis moderados de dano ao DNA podem disparar uma parada do ciclo celular e iniciar o processo de reparo, que irá assegurar a integridade do DNA. Em contraste, o excesso de danos ou falha no reparo do DNA pode induzir morte celular por apoptose (DAVID, 2007). Modificações oxidativas em lipídios, proteínas ou DNA desencadeia uma série de processos fisiológicos tais como diferenciação, maturação e tráfego de vesículas intracelulares (DROGE, 2002). No entanto, quando os níveis de EROs estão em excesso, as consequências biológicas são geralmente deletérias (TRACHOOTHAM, 2008).

Alterações nos níveis de EROs podem modular atividades biológicas através de estimulação/supressão aberrante de certas vias de sinalização e através de modificações diretas de biomoléculas, especialmente proteínas. O sistema redox pode modificar as funções das proteínas por meio de regulação da expressão, modificações pós-traducional e estabilidade (TRACHOOTHAM, 2008).

Vários grupos, como os de Aithal e colaboradores (2009), Hallak e colaboradores (2009), Xu e colaboradores (2012), Lee e colaboradores (2012), entre outros, verificaram a indução de EO em células tumorais após a exposição a variados derivados naftoquinônicos, estresse gerado tanto através da produção de ERO como pela depleção dos sistemas antioxidantes, tais como a glutathione peroxidase. Como consequência, foi relatada a ocorrência de danos à membrana celular, mitocôndrias, apoptose e necrose. Nos danos mitocondriais pode ocorrer a translocação de proteínas pró-apoptóticas do citosol para a membrana mitocondrial, levando à formação de poros por onde sai o citocromo c. Este se liga ao fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (APAF-1) e à caspase 9, formando um complexo chamado apoptossoma, que leva à ativação de caspase 3. Caspases são proteases essenciais no processo de apoptose e que podem ser ativadas de maneira dependente ou independente do citocromo c (Revisado por ARAÚJO et al., 2012). Montenegro e colaboradores (2010) demonstraram que a 5-metoxi-1,4-naftoquinona (juglona) pode induzir apoptose através da ativação das caspases 8, 3 e 7, de modo independente das mitocôndrias. A partir dessas informações, torna-se imperativo os estudos que envolvam as naftoquinonas e a modulação do EO como mecanismo fundamental para morte celular.

Diante de todo esse cenário que alia a urgência de novas terapias para o tratamento de paciente com CP e a busca por novas drogas de origem natural, nosso grupo delineou estudos com novos compostos naftoquinônicos derivados da Lausona, denominados PIC20 e PIC21 para elucidar se há citotoxicidade dos compostos em linhagem de câncer de pulmão *in vitro* e relacionar o possível envolvimento de EROs para ocorrência da morte celular *in vitro*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral a investigação da eficácia antineoplásica dos derivados naftoquinônicos PIC20 e PIC21 em linhagem de CP – H460, em monoterapia e em combinação com a enzima superóxido dismutase.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

Para atender ao objetivo geral proposto, delineamos os objetivos específicos, a saber:

1. Avaliação da citotoxicidade de PIC20 e PIC21, em ensaios *in vitro* e a combinação com SOD em linhagem de câncer de pulmão;
2. Possível relação das espécies reativas de oxigênio no efeito citotóxico dos compostos PIC20 e PIC21, no tratamento do CP – H460;



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CULTURA DE CÉLULAS

#### 4.1.1 Linhagem celular

A linhagem celular empregada nesse estudo foi a H460. Segundo a “*American Type Culture Collection*” (ATCC), tais células apresentam morfologia epitelial e crescem de maneira aderente em cultura. Quanto à histologia, a linhagem é oriunda de carcinoma de pulmão do tipo NSCLC; mais especificamente, a linhagem H460 configura-se como carcinoma de células grandes.

#### 4.1.2 Descongelamento

As alíquotas da linhagem celular armazenada em congelador -80°C foram descongeladas em banho-maria a 37°C. O conteúdo armazenado no microtubo de 1,5 mL foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL estéril com 10 mL de meio RPMI-1640 (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA) acrescido de soro fetal bovino a 10% v/v (SFB, Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA), solução estabilizada de Penicilina-Streptomicina numa concentração de 10000 unidades de Penicilina e 10 mg de Streptomicina por mL (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e fungizone – Anfotericina B a 250 ug/mL (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1162 x g, a temperatura ambiente. Após a centrifugação, foi observado um *pellet* no fundo do tubo, e o sobrenadante foi descartado. As células foram então ressuspensas em 15 mL de RPMI suplementado de acordo com descrito acima e cultivadas conforme será descrito no item seguinte.

#### 4.1.3 Cultivo

As células foram mantidas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>, em 15 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, 1% de solução estabilizada de penicilina-estreptomicina (10000 unidades de penicilina e 10 mg de estreptomicina por mL) e 0,5% de anfotericina B a 250 ug/mL. O cultivo deu-se em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até a subconfluência. Diariamente as garrafas foram

analisadas em microscópio óptico de luz invertida, para avaliar o aspecto do meio e das células em cultivo, bem como sua taxa de crescimento e confluência.

#### 4.1.4 Criopreservação

As garrafas de cultivo com a linhagem celular subconfluente eram lavadas com soluções de PBS 1X por três vezes. Adicionaram-se 3 – 5 mL de solução de tripsina-edta (0,25%) às garrafas, que eram incubadas por até 5 min e agitadas periodicamente para contribuir para o desprendimento celular. Em seguida, foram acrescentados aproximadamente 3 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB para bloquear a ação da tripsina, e a solução transferida para um tubo cônico de 50 mL. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a  $1162 \times g$ , a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, mantendo o *pellet* no fundo do tubo, e adicionados 3 mL da solução de criopreservação (soro fetal bovino com 10% de glicerol), homogeneizando com uma pipeta. Em seguida, transferiu-se 1 mL da solução para cada criotubo de 1,5 mL. Totalizando três alíquotas por amostra. As alíquotas foram então mantidas durante 30 minutos a 0°C, em seguida duas horas a -20°C e finalmente armazenadas a -80°C.

#### 4.1.5 Plaqueamento

As células foram mantidas e tripsinizadas conforme descrito nos itens anteriores. Após ressuspensão das células em meio RPMI contendo 10% SFB, uma alíquota de 15  $\mu$ L da suspensão celular era misturada (1:1) com azul de tripan (Sigma Aldrich) e fazia-se a contagem em câmara de Neubauer. A seguinte fórmula foi usada para cálculo do número total de células:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/mL} = \text{N}^\circ \text{ total de células} / \text{N}^\circ \text{ de quadrantes} * \text{Fator de diluição (2)} * 10000$$

Conforme o experimento, as células eram então cultivadas em placas 96 poços. As células foram semeadas na densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço, em um volume final de 100  $\mu$ L/poço. Após serem semeadas, as células eram mantidas nas condições padrão de cultivo até que aderissem ao fundo do poço (16-18h).

#### 4.1.6 Ensaio de viabilidade

Para os ensaios de viabilidade celular metabólica, realizados em placas de 96 poços, uma vez que as células estavam aderidas, desprezava-se o conteúdo de cada poço e, em seguida, eram adicionados 90 µL de meio de cultura sem SFB e 10 µL de cada uma das cinco diferentes concentrações de cada uma das drogas testadas (PIC 20 e PIC 21) por poço. Uma vez que as drogas são diluídas em dimetilsufóxido (DMSO) 2%, uma solução de DMSO nesta concentração foi utilizada como controle negativo.

Para os testes com pré-tratamento com a superóxido dismutase (SOD), as células foram incubadas com 60 unidades da enzima de SOD e meio de cultura sem SFB por 1h antes de serem tratadas com os compostos PIC20 e PIC21, conforme descrito no parágrafo acima, sem a lavagem do poço para o tratamento com os compostos. Mantendo-se sempre as mesmas concentrações.

#### 4.2 ENSAIO DE VIABILIDADE METABÓLICA CELULAR

Após as 24 horas de incubação com os compostos anteriormente citados, o meio foi removido e 15 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio (MTT) na concentração de 5 mg/mL foram adicionados em cada poço. A incubação com MTT deu-se por 4 horas e, em seguida, adicionou-se 100µL de DMSO para dissolução dos cristais de formazan formados. Vale ressaltar que o método de análise colorimétrica com o MTT permite mensurar o metabolismo celular pela redução deste sal por ação da succinato-desidrogenase mitocondrial, resultando na formação de cristais de formazan, cuja produção é proporcional ao número de células metabolicamente ativas. A leitura dos resultados, dois experimentos independentes em quadruplicata, foi realizada em espectrofotômetro (MR-96 A, Bioclin, Minas Gerais, Brasil) no comprimento de onda de 560 nm.

### 4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram efetuadas usando o teste ANOVA de uma via, com significância de 5%, com pós-teste de Bonferroni. O programa usado para os cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism 5 para Windows (Versão 5.00.288).

## 5 RESULTADOS

Inicialmente foram calculadas as porcentagens da viabilidade metabólica celular (VMC (%)) resultante do tratamento das células de CP H460 com os compostos PIC20 e PIC21, conforme verificado em ensaio de MTT, utilizando o grupo das células tratadas com DMSO 20% como controle. Observamos que não há alteração estatisticamente significativa em relação às doses do composto que estão entre  $10^{-8}$  M e  $10^{-5}$  M, todavia quando comparado a dose de  $10^{-4}$  M em relação a todas outras doses, essa sim, foi estatisticamente significativa em todos os casos para a redução da VCM (%), com  $p < 0,0001$  (Figura 6A). Entretanto, ao utilizar o composto PIC21, os resultados mostram efeito dose-dependente mais definido nas diferentes concentrações utilizadas, destacando-se a maior concentração,  $10^{-4}$  M, que alcançou o menor valor da VMC (%), igualmente quando utilizado o composto PIC20 (Figura 5B). Assim, os dados indicam que existe um efeito citotóxico pronunciado dos compostos inéditos sintetizados na dosagem de  $10^{-4}$  M e constatar que há um efeito diferenciado dos compostos, PIC20 e PIC21, nas células de CP H460.

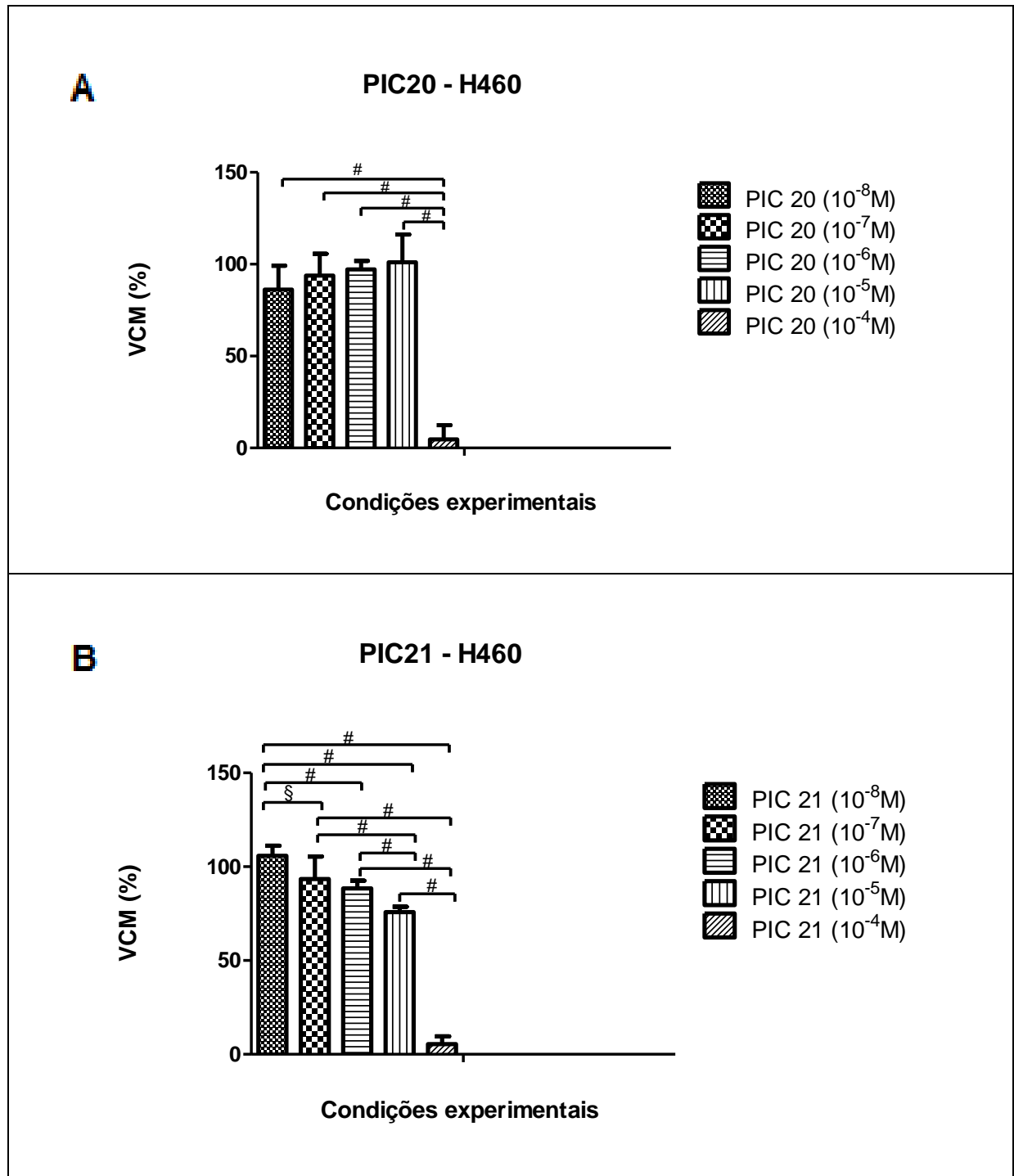


FIGURA 5 – **A:** Comparação dos efeitos do composto PIC20 sobre a viabilidade celular metabólica (VCM(%)) na linhagem de CP – Após tratamento com diferentes concentrações molares –  $10^{-8}$ ;  $10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-4}$  pelo método de Anova de uma via (significância de 5%) e post-test de Bonferroni. **B:** Comparação dos efeitos do composto PIC21 sobre a viabilidade celular metabólica (VCM(%)) na linhagem de CP – Após tratamento com diferentes concentrações molares –  $10^{-8}$ ;  $10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-4}$  pelo método de Anova de uma via (significância de 5%) e post-test de Bonferroni. Significância #: 0,0001; §: 0,001; \*:0,05. ( $P < 0,05$ ).

Paralelamente às análises anteriores, no intuito de se verificar a possibilidade da relação do efeito dos compostos com as EROs, realizamos o pré-tratamento com SOD seguido do tratamento com os compostos PIC20 e PIC21 e novamente o ensaio de MTT. Assim sendo, observamos que há diferença significativa dos resultados obtidos em relação ao primeiro teste. No grupo tratado com o composto PIC20, observamos que houve uma diminuição da VCM (%) de forma dose dependente (Figura 6A). No grupo tratado com o composto PIC21, é observado uma alteração no perfil da curva dose-resposta (Figura 6B).

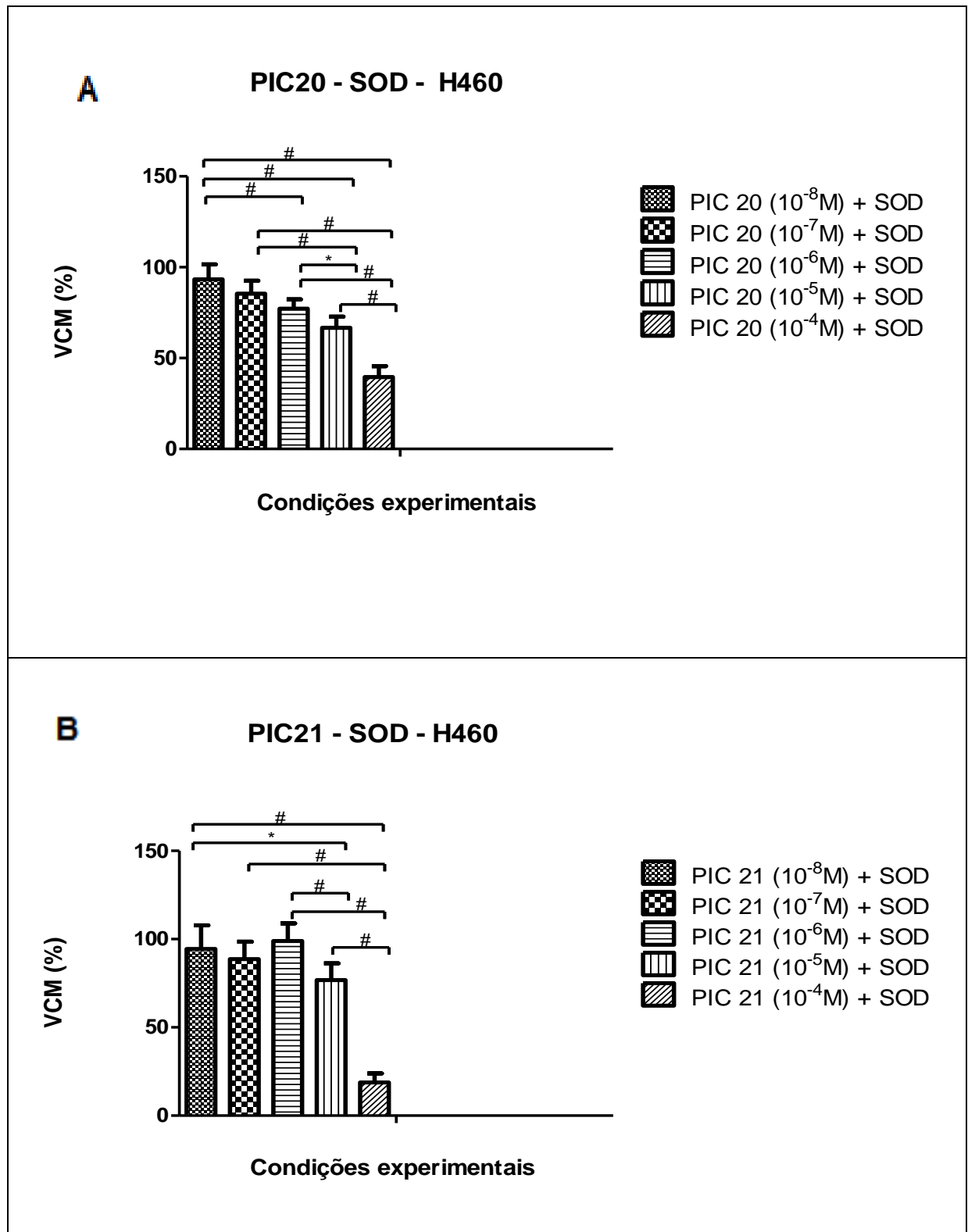


FIGURA 6 – **A**: Comparação dos efeitos do composto PIC20 sobre a viabilidade celular metabólica (VCM(%)) na linhagem de CP – Após tratamento com diferentes concentrações molares –  $10^{-8}$ ;  $10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-4}$  pelo método de Anova de uma via (significância de 5%) e post-test de Bonferroni. **B**: Comparação dos efeitos do composto PIC21 sobre a viabilidade celular metabólica (VCM(%)) na linhagem de CP – Após tratamento com diferentes concentrações molares –  $10^{-8}$ ;  $10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-4}$  pelo método de Anova de uma via (significância de 5%) e post-test de Bonferroni. Significância #: 0,0001; §: 0,001; \*:0,05. ( $P < 0,05$ ).



No intuito de observar se há diferença significativa entre os diferentes tratamentos, grupos tratados apenas com os compostos PIC20 e PIC21 em relação aos grupos com o pré-tratamento de SOD seguido do tratamento com os compostos PIC20 e PIC21, analisamos os dados comparativamente. Analisando os resultados dos testes com PIC20 é possível notar que houve diferença estatística na VCM (%) quando comparadas as condições experimentais: Não tratado < Tratado apenas com SOD 60U ( $p < 0,05$ ),  $10^{-6}\text{M} > 10^{-6}\text{M} + \text{SOD}$  ( $p < 0,0001$ ),  $10^{-5}\text{M} > 10^{-5}\text{M} + \text{SOD}$  ( $p < 0,0001$ ),  $10^{-4}\text{M} < 10^{-4}\text{M} + \text{SOD}$  ( $p < 0,0001$ ) (Figura 7). Dentre esses dados, destacam-se os dados que apontam para alteração da tendência de diminuição da VCM (%) na concentração mais elevada do composto,  $10^{-4}\text{M}$ , que obteve um nível de significância de  $p < 0,001$  e o dado que mostra que o pré-tratamento com SOD apenas é capaz de aumentar a VCM (%) em relação ao não tratado ( $p < 0,05$ ).

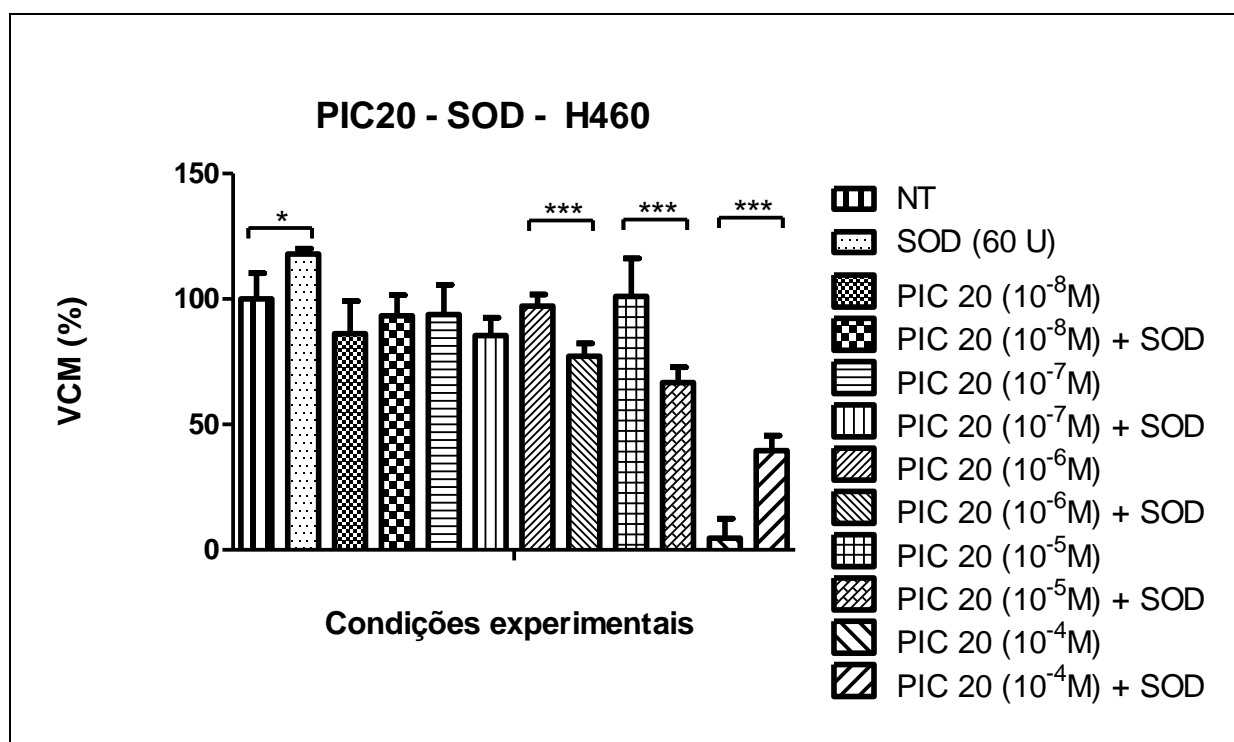


FIGURA 7 – Comparação dos efeitos do composto PIC20 sobre a viabilidade celular metabólica (VCM(%)) na linhagem de CP – Após tratamento com diferentes concentrações molares –  $10^{-8}$ ;  $10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-4}$ , com e sem pré-tratamento de SOD (60U) pelo método de Anova de uma via (significância de 5%) e post-test de Bonferroni. Significância \*\*\*: 0,0001; \*\*: 0,001; \*: 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Da mesma forma, procedemos às análises comparativas para os dados gerados a partir da PIC21 para obtermos confirmação de que os dados encontrados condizem com um achado plausível. E assim sendo, observamos que houve diferença estatística na VCM (%) quando comparadas as condições experimentais: Não tratado < Tratado apenas com SOD 60U ( $p<0,05$ ),  $10^{-8}\text{M}>10^{-8}\text{M}+\text{SOD}$  ( $p<0,05$ ),  $10^{-4}\text{M}<10^{-4}\text{M}+\text{SOD}$  ( $p<0,05$ ) (Figura 8). E, mais uma vez, destacam-se o dado que aponta a inversão da tendência da diminuição da VCM (%) quando utilizamos a droga em sua maior concentração,  $10^{-4}\text{M}$ , pré-tratada com SOD ( $p<0,05$ ) e o dado que mostra que o pré-tratamento com SOD apenas é capaz de aumentar a VCM (%) em relação ao não tratado ( $p<0,05$ ).

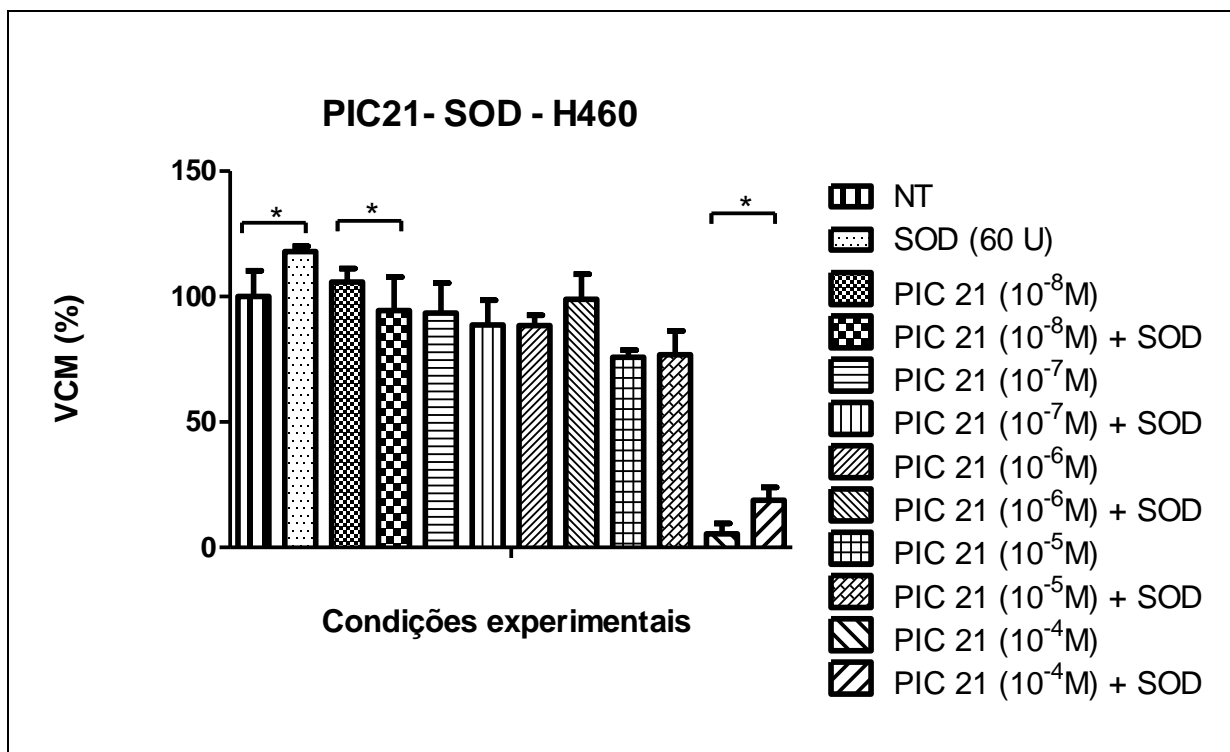


FIGURA 8 – Comparação dos efeitos do composto PIC21 sobre a viabilidade celular metabólica (VCM(%)) na linhagem de CP – Após tratamento com diferentes concentrações molares –  $10^{-8}$ ;  $10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-4}$ , com e sem pré-tratamento de SOD (60U) pelo método de Anova de uma via (significância de 5%) e post-test de Bonferroni. Significância \*\*\*: 0,0001; \*\*: 0,001; \*: 0,05 ( $p<0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

O CP permanece como um grande desafio para a saúde em torno do mundo, por apresentar taxas de sobrevida em cinco anos relativamente baixas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009), apesar dos esforços dedicados às melhorias no estadiamento e na aplicação integrada de cirurgia, radioterapia e quimioterapia observadas. O acúmulo sequencial de alterações genéticas e também as alterações morfológicas, que culminam com a modificação na evasão da apoptose, estabilidade e reparo do DNA, invasão tecidual, metástase e angiogênese, são as características marcantes para o CP. Ao longo do tempo, carcinomas classificados como NSCLC (adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes) eram tratados de maneira similar, apesar de heterogeneidade biológica consequente das diferenças histológicas. É provável que a pobre resposta aos tratamentos observada para pacientes com NSCLC se deva, ao menos em parte, ao emprego de terapias relativamente homogêneas frente a uma doença com características heterogêneas. Desse modo, acredita-se que o surgimento de terapias potentes para o combate do câncer consiga trazer uma sobrevida maior ao paciente acometido por essa malignidade.

As drogas utilizadas atualmente no tratamento quimioterápico apresentam os mais variados mecanismos de ação e são administradas sozinhas ou em combinação a outros tratamentos como radioterapia e cirurgia. Contudo, estes tratamentos ainda apresentam efeitos nocivos, como por exemplo, o surgimento da resistência, que podem variar entre os indivíduos e, de certa maneira em alguns tipos de câncer, é insuficiente para o tratamento. Além disso, também existe o pobre estudo de novos compostos para o combate do carcinoma de células grande. Partindo dessa necessidade urgente de se obter novas terapias alternativas e aumento do prognóstico do paciente acometido pelo CP, vários estudos têm apresentado novas substâncias com possíveis atividades antitumorais.

Demonstrado esse cenário, de intensificação pela busca de novos elementos que sejam citotóxicos na carcinogênese pulmonar, a realização de estudos de potenciais drogas é fundamental. Com esse intuito, os compostos inéditos derivados de naftoquinonas – PIC20 e PIC21- foram o foco do nosso estudo, a fim de certificar

que os novos compostos sintetizados apresentam efeitos citotóxicos, tal qual aos compostos naftoquinônicos descritos na literatura e, também, verificar se as EROs estão envolvidas no efeito citotóxico, provocando a morte celular. Dessa forma, busca-se um aprofundamento nos conhecimentos sobre a funcionalidade desses compostos, visando acrescentar informações que estabeleçam uma base para o delineamento de novas pesquisas.

Como citado anteriormente, para o início do desenvolvimento do nosso estudo foi realizado a síntese do novo composto, sendo que esses foram realizados no Laboratório de Pesquisas em Química Orgânica, do Departamento de Química, da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo professor Dr. Sandro Greco. O professor em parceria com o nosso laboratório desenvolveu compostos naftoquinônicos inéditos, comprovados através da pesquisa anterioridade em bancos de patentes. Depois de verificado o ineditismo dos compostos, esses foram submetidos a processo de patente, e por essa razão não será mostrado os processos e modificações químicas realizadas para geração dos novos compostos.

A análise da viabilidade e proliferação celular formam a base de numerosos testes *in vitro* que procuram entender a resposta de uma população celular à fatores externos. Autores já compararam a resposta de 197 compostos em 38 linhagens tumorais representando sete tipos de tumores em ensaios de microplacas utilizando MTT e sulforadamina B (RUBSTEIN *et al.*, 1990). O teste de MTT para ensaios de microplacas desenvolvido por Mosmann (1983) utiliza o sal tetrazolium de MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-dyphenyltetrazolium bromide) que possui coloração amarela. No ensaio, o MTT é reduzido nas células metabolicamente ativas gerando cristais de formazan, de coloração púrpura, que são solubilizados e quantificados através de espectrofotometria. A intensidade da atividade metabólica indica o grau de viabilidade das células, quanto maior a citotoxicidade promovida pelas substâncias menor será a intensidade metabólica e conseqüentemente menor será a absorbância da solução (BERRIDGE *et al.*, 2005).

O DMSO (Dimetil Sulfoxido –  $\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ), é um composto amplamente utilizado como agente para dissolver substâncias, por ter o potencial capacidade de dissolver tanto compostos polares quanto apolares e pode ser misturado em grande variedade de

solventes orgânicos, como a água. Ele também é frequentemente usado em reações que envolvem carboidratos, peptídeos, polímeros e sais. Por possuir tais características, acaba sendo amplamente utilizado em amostras que irão ser avaliadas em testes biológicos. Em nosso estudo ele foi empregado justamente por conter essas características, sendo assim todos os dois compostos foram dissolvidos em DMSO. No entanto, é reconhecido também que o DMSO desempenha papel citotóxico dependendo da sua concentração utilizada (MUIR, 2007). Para tanto, avaliamos a citotoxicidade em ausência e presença de DMSO e observamos que não ocorreu redução significativa do crescimento celular, em outras palavras, na concentração de 2%, o DMSO não apresenta efeito citotóxico significativo. Mesmo com a certeza de que o DMSO não iria interferir nos resultados obtidos, as análises da citotoxicidade das substâncias foram sempre realizadas em relação a um controle possuindo a quantidade proporcional de DMSO, padronizando-o como controle negativo dos testes, uma vez que iríamos proceder outras avaliações experimentais.

Para a análise de novas drogas, utilizamos cinco concentrações diferentes para os dois compostos (SHOEMAKER, 2006). Ao observarmos os gráficos estatísticos para PIC21, temos uma resposta dose-dependente na viabilidade celular nas células H460, o que está em consonância com os achados para o  $\beta$ Lapachol, também um composto naftoquinônico com perfil da redução da viabilidade celular dose-dependente (CHOI *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003). Novamente, como perfil comparativo, o composto PIC20 foi avaliado em diferentes dosagens, e os dados gerados mostram que a utilização do composto reduz acentuadamente a VCM (%) quando utilizado a maior dose do composto  $10^{-4}$ M e não apresenta curva dose-resposta clássica nas concentrações utilizadas no presente trabalho.

Os dados do tratamento com os compostos PIC20 e PIC21 corroboram os dados da literatura para a citotoxicidade existente em linhagens de câncer de pulmão quando expostas a compostos naftoquinônicos (ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2008, BEY *et al.*, 2007, SU *et al.*, 2010). Cabe ressaltar que em virtude da obtenção dos resultados promissores dos nossos testes, com a diminuição significativa da VCM (%), os compostos ganharam ainda mais interesse de serem submetidos ao processo de

patente, o qual irá garantir o ineditismo dos compostos e consequentemente agregar valor aos estudos realizados no campus da UFES.

Através de análises é possível indicar que compostos naftoquinônicos inéditos apresentam efeito sobre a viabilidade (VALKO, 2007, SILVA *et al.*, 2003) e esse efeito citotóxico dos compostos contra as células cancerosas pode estar associado sobre dois mecanismos descritos na literatura: o estresse oxidativo e a inibição da topoisomerase II (WATANABE, 2003). Sendo que, a demonstração da ocorrência de transferência de elétrons em reações de oxidação-redução, tendo como agente transferidor de elétrons os compostos naftoquinônicos, chama a atenção para importância desse mecanismo para uma ação antitumoral potente (KUMAGAI, 2012).

Como base para nosso estudo seguimos o que foi desenvolvido por Esteves-Souza e colaboradores (2008), que trabalham igualmente com derivados naftoquinônicos racionalmente desenvolvidos para o combate do câncer e com a hipótese de que haja relação da presença de EROs para a citotoxicidade apresentada pelos compostos. De forma análoga, procedemos com os testes utilizando a SOD derivada de eritrócitos bovino, como agente antioxidante, para alteração do perfil de EROs nos ensaios *in vitro*. A SOD derivada de eritrócitos bovinos foi a primeira SOD a ser encontrada em tecidos de mamíferos (McCORD; FRIDOVICH, 1969), ela é uma proteína homodimérica com duas subunidades de 16,3 kDa de 151 aminoácidos (CASS, 1985). A SOD desempenha o papel de defesa das células contra os efeitos tóxicos dos radicais de oxigênio, em estudos com folículos ovarianos de ratos e linhagens de células neurais foi visto uma supressão da apoptose na presença de SOD [TILLY; TILLY, 1995; KELLER *et al.*, 1998]. A SOD catalisa a conversão de radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, reação vista na Figura 2. A SOD é então dessa forma capaz de alterar o perfil de EROs no microambiente tumoral.

Assim sendo, nosso grupo iniciou estudos que busquem a elucidação do mecanismo de ação envolvido na citotoxicidade dos novos compostos. Baseado nos dados que demonstram grande potencial das naftoquinonas de formarem EROS no microambiente *in vitro* (KUMAGAI, 2012), delineamos experimentos que buscassem

a interação desses após o tratamento das células. Liu e colaboradores (2012) desenvolveram um trabalho relacionando a alteração da viabilidade celular em decorrência das variações das EROs no microambiente *in vitro* após o tratamento com a droga SU11274, onde encontram que na presença de superóxido e peróxido de hidrogênio a célula de CP – NSCLC – A549 sobrevivia ao tratamento com a droga utilizando as vias de c-Met-PI3K-AKT e c-Met-Grb2/SOS-Ras-p38. Nosso grupo baseou-se nesse estudo para também identificar tais variações na viabilidade que poderiam ser associados à diminuição de superóxido e o aumento de peróxido de hidrogênio.

Notamos que o pré-tratamento com SOD alterou o perfil dose-resposta dos compostos em algumas das concentrações utilizadas. Isso pode ter ocorrido pelos diferentes mecanismos que esses compostos possuem sobre a célula. Estudos mostram que há alterações no potencial citotóxico de derivados naftoquinônicos dependente dos substituintes utilizados na estrutura principal do composto (ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2008). Nesse ínterim, é possível compreender o motivo pelo qual as naftoquinonas são apresentadas com mecanismos de ação distintos (KUMAGAI, 2012). Podemos sugerir, ao menos em parte, que os compostos PIC20 e PIC21 têm mecanismos de ação distintos, uma vez que é observada uma alteração de suas atividades quando há um pré-tratamento com SOD, que irá diminuir o acúmulo de superóxido e aumentar a concentração de peróxido de hidrogênio no microambiente *in vitro*. Inferimos dessa forma que, uma melhor ação do composto PIC20, sobre as células tumorais de CP – H460, pode estar fortemente ligado ao acúmulo de peróxido de hidrogênio no microambiente e a ação do composto PIC21 parece ser independente desse acúmulo de peróxido de hidrogênio.

Ainda a respeito do composto PIC21, no que diz respeito à alteração de seus efeitos citotóxicos após o tratamento com SOD, ensaios realizados em nosso laboratório utilizando-o em linhagens de câncer de mama triplo negativo e de ovário mostraram que há uma inibição em PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinases*) pelo composto (MADEIRA, K. P., dados não publicados; DALTOÉ, R. D., dados não publicados). PI3K é um mediador entre o receptor do fator de crescimento e o desencadear das vias de sinalização intracelular (JIMENEZ *et al.*, 1998). Mutações nesse gene têm

sido identificadas em câncer de pulmão (KANDOTH *et al.*, 2013; SAMUELS *et al.*, 2004) e inibidores com alvo para as proteínas PI3K e mTOR têm demonstrado efeito antitumoral em camundongos (ELGELMAN *et al.*, 2008). Ademais, faz-se necessário destacar que a ativação da via PI3K por EROs auxiliou a evasão à apoptose (LIU *et al.*, 2012), logo a retirada de EROs por SOD pode estar influenciando também a ativação dessa via. Diante do exposto, podemos direcionar nossos estudos para a confirmação da inibição de PI3K em linhagem de CP – H460 utilizando nosso novo composto, PIC21.

O dado que mais chama atenção do nosso estudo é quando comparamos as diferenças estatísticas da VCM (%) nas células com e sem pré-tratamento com SOD na maior concentração –  $10^{-4}$ M – para ambos os compostos. Nessas condições foi possível observar um efeito protetor, por haver uma reversão parcial da VCM (%), sendo que para PIC20 o efeito foi mais importante. Isso torna nosso achado paradoxal com as informações apresentadas até o momento.

No entanto, o estresse oxidativo pode ser resultado de inúmeras variáveis que culminam com o surgimento de EROs, dentre um dos possíveis formadores do estresse oxidativo encontra-se a fosforilação oxidativa mitocondrial. A mitocôndria é a principal fonte formadora de EROs, por ser grande consumidor de moléculas de oxigênio nas células (ADDABBO *et al.*, 2009, ARCHER *et al.*, 2008). O sistema de defesa celular é repleto de enzimas com a função de desintoxicação, como a Glutathione-S-Transferase (GSTs), Glutathione Peroxidase (GPx), Catalase, Superóxido Dismutase (SOD) entre outros mais, e a expressão dessas proteínas protege as células do dano oxidativo e pode prevenir o mutagêneses e câncer (POOL-ZOBEL *et al.*, 2005; BARVE *et al.*, 2009; KUMARAGURPARAN *et al.*, 2007). Tem sido relatado que as células de câncer encontram-se em um estado de desequilíbrio-redox, que representa uma alteração da homeostase entre agentes oxidantes e antioxidantes, resultando em um aumento de agentes oxidantes na célula (WU & CEDERBAUM, 2009). Logo, a presença do estresse oxidativo pode induzir respostas positivas, como a proliferação, em células de câncer (ARNER & HOLMGREN, 2006).



Em um estudo realizado por Chandel *et al.* (2000), revelou-se que a EROs derivada da mitocôndria é tanto requerido como também suficiente para estabilização do HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible fator-1 $\alpha$* ). HIF-1 $\alpha$  é um fator de transcrição heterodimérico, subunidade HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$  e sua significância na regulação transcricional foi recentemente demonstrada (IYER *et al.*, 1998; MALTEPE, 1997). Apesar de muito ter sido aprendido sobre o papel de HIF-1 no controle da expressão de genes responsivos a hipóxia, a maneira pela qual as células detectam a diminuição de oxigênio e iniciam a estabilização de HIF-1 $\alpha$  não é conhecido. Foi postulado que a inibição parcial do transporte de elétrons mitocondrial, produzindo mudanças no balanço redox na via de elétrons, aumenta a geração de EROs. Esses oxidantes então entram no citosol e funcionam como segundo mensageiro na via de sinalização e subsequente estabilização de HIF-1 $\alpha$  (CHANDEL, 1988). O que se sabe de fato é que o peróxido de hidrogênio é o principal agente para que ocorra a estabilização de HIF-1 $\alpha$ , independentemente da mitocôndria, e surpreendentemente a via de PI3K pode estar envolvida no mecanismo de estabilização, tal que quando essa via é inibida, por wortmannin e LY294002, observa-se abolição da estabilização de HIF-1 $\alpha$  mesmo em presença de peróxido de hidrogênio (CHANDEL *et al.*, 2000). Logo, acreditamos que exista a produção de EROs quando utilizamos os compostos, PIC20 e PIC21, e que os valores mais altos de EROs presentes no microambiente sejam alcançados na concentração de  $10^{-4}$  M. Se isso for uma verdade, explicaria o motivo pelo qual ocorre diminuição acentuada da VCM (%) quando há apenas a droga, porém ao acrescentar o pré-tratamento com SOD, levando ao acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow SOD \rightarrow H_2O_2$ ), ocasiona a evasão da morte celular através da ativação da via PI3K e, conseqüentemente, levando a maior estabilização de HIF-1 $\alpha$ .

Uma segunda hipótese para o aumento da viabilidade celular nas células pré-tratadas com SOD e os compostos PIC20 e PIC21, é diretamente relacionado ao comportamento estrutural do composto. Como dito anteriormente, é bem estabelecido que a toxicidade dos derivados naftoquinônicos é mediado por produção de EROs, contudo estudos mostram que a citotoxicidade pode ser atenuada por SOD ou catalase extracelular (NUTTER *et al.*, 1992; ABE & SAITO, 1996). Porém, é possível que a apoptose induzida pelos derivados quinônicos, aumenta ainda mais a produção de  $H_2O_2$ , através do aumento da concentração de

quinonas, que por sua vez desempenha um papel antiapoptótico por inativação dos componentes de sinalização sensíveis à oxidação, como por exemplo as caspases (SAMALI, 1999).

Uma última hipótese, ainda considerando a hipótese de que os compostos produzem grandes quantidades de EROs na maior concentração, é de que as células de câncer são caracterizadas por rápido e incontrolado crescimento e migração, o qual pode ser atribuído ao aumento de receptores para o fator de crescimento e de vias de sinalização intracelulares relacionados à proliferação (DUAN *et al.*, 2010; MOON *et al.*, 2006). c-Met é um receptor tirosina quinase que é superexpressado em vários tipos de câncer (LIU *et al.*, 2012). c-Met é um regulador crucial em tumores descontrolados para o crescimento e migração, como se ele fosse capaz de ativar a via comum das quinases, como MAPKs e AKT (YANG *et al.*, 2010; ZUCALI *et al.*, 2011). Pramanik *et al* (2003) reportou que a grande presença de EROs aumentou a expressão e ativação de c-Met e promoveu o aumento da invasividade em células de melanoma humano – Hs29-4T. O trabalho de Wang *et al.* (2010) revelou que a utilização da droga silibina era associada à produção de EROs de forma tempo e dose dependente, e a geração de superóxido induzida pela droga foi capaz de induzir a expressão de EGRF. O efeito protetor do superóxido foi relevante para regulação da expressão da tirosina quinase. Sendo que, o peróxido de hidrogênio induz fosforilação de c-Met e ativa, além de c-Met, alvos seguintes da sua via de sinalização, incluindo fosfo AKT e anti-fosfo ERK1/2 (BROGNARD *et al.*, 2001).

Com base em nossos dados e na literatura obtivemos que existe uma grande possibilidade das EROs terem relação com o efeito dos compostos utilizados e levantar hipóteses do motivo que poderia estar envolvido para a ocorrência do aumento da VCM (%) com o pré-tratamento de SOD na maior dose dos compostos. Porém, trabalhos com EROs representam um grande desafio. As EROs são difíceis de se distinguir uma das outras por ensaios específicos e a sua quantificação também representa um desafio. Ademais, os efeitos proporcionados por EROs são por vezes ditos paradoxais – por exemplo, os nossos resultados sugerem que a morte celular é revertida parcialmente com a utilização de SOD, que é um formador

da espécie peróxido de hidrogênio, ou seja, as EROs têm relação com a promoção prevenção da morte celular.

É geralmente considerado que EROs poderá promover tanto proliferação celular como a morte celular dependendo da sua intensidade e localização do efeito oxidativo e da atividade do sistema antioxidante (MANDA et al, 2009). Considerando os sinais de proliferação deflagrados pelas EROs para as células de câncer e consequente resistência para os sinais pró-apoptóticos (DAVIS, 2000), a morte celular induzida por EROs é mais provável de ser alcançada através de terapias antineoplásicas geradoras de ROS, as quais aumentam o perfil oxidativo constitutivo a níveis a cima do limiar requerido para que ocorra morte celular. Todavia, CHANDRA et al. (2000) mostrou que o excessivo estresse oxidativo pode inibir a apoptose ao nível das caspases, por necessitarem de um ambiente redutor para obter uma atividade ótima.

As células de câncer apresentam-se com uma particular situação de oxidação endógena e exógena, altamente diferenciada de acordo com o tipo celular e o estágio de evolução tumoral. Sendo que o tumor adapta-se a essas condições extremas, desenvolvendo potentes mecanismos antioxidantes, e até mesmo utilizando EROs endógeno para proliferação (MANDA *et al.*, 2009). Embora a resistência intrínseca das células de câncer para a morte celular induzida por EROs exista, terapias que conseguem gerar grande aumento oxidativo em tumores, como nossos compostos, têm sua eficiência comprovada. Para obtenção do efeito com essas terapias os níveis de EROs devem ultrapassar o limiares de resistência, alcançando a morte da célula tumoral. Por haver essa distinção do controle de morte celular induzido por EROs em células normais e neoplásicas, muito provavelmente por diferentes fatores pro-/anti- apoptóticos e por diferentes elementos chaves pro-/anti- oxidante. As novas estratégias terapêuticas antineoplásicas, baseadas na formação de EROs e/ou modulação de mecanismos antioxidantes visão tirar vantagem justamente das diferenças existentes entre a regulação das células normais e células de câncer, com isso a combinação de quimioterápicos com modificadores do sistema redox celular têm mostrado resultados promissores em triagens clínicas (PEGGRAM *et al.*, 2000).

Ademais ao desenvolvimento de terapias antineoplásicas, temos que levar em conta que todos os antioxidantes não podem ser tratados como iguais, quando avaliados em relação ao seu impacto na quimioterapia, e propor que um único antioxidante irá ter o mesmo impacto em todos os agentes quimioterápicos (CONKLIN, 2004), o que verificamos nas alterações dos perfis da VCM (%) do composto PIC20 com e sem o pré-tratamento com SOD, que não ocorreu de forma similar ao composto PIC21, isso indica que existe a necessidade de mais investigações para elucidar as condições-redox requeridas para uma eficácia ótima dos nossos compostos. Aliado aos fatos citados, temos que a resposta dos compostos podem variar de acordo com o tipo celular testado (LIU *et al.*, 2012), ou seja, sugere que o mecanismo pode não ser específico para todas as linhagens de câncer, logo o mecanismo para a geração de EROs depende da categoria da célula estudada. Isso abre portas para novos estudos com diferentes linhagens celulares, tanto de CP, como outros cânceres e até mesmo fazer um comparativo com linhagens de células normais.

As naftoquinonas demonstram ser uma classe interessante de compostos com atividade citotóxica variada, propriedade que pode ser explorada no tratamento de vários tipos de câncer. Modificações estruturais são de suma importância para estratégia de produção de novos compostos com maior atividade e seletividade contra as células tumorais e menores efeitos em células normais e necessário o entendimento dos mecanismos que estão sendo ativados/bloqueados pelo composto para se alcançar uma terapia ótima.

No presente estudo, observamos que os compostos inéditos sintetizados possuem efeitos citotóxicos contra o CP, o qual urge pela necessidade de novas terapias. Sendo assim, a continuação dos estudos *in vitro* torna-se fundamental para elucidação completa das características dos novos compostos a fim de que essas drogas alcancem os ensaios clínicos em animais, em seguida em humanos até que, por fim, cheguem a ser considerados terapias alternativas confiáveis e assim consigam ajudar pacientes acometidos por essa malignidade tão fatal.

## 7 CONCLUSÃO

Os dados do presente trabalho nos permitem concluir que:

1. PIC20 e PIC21 diminui a viabilidade celular em linhagens de H460 representativas do subtipo histológico NSCLC – Carcinoma de Células Grandes;
2. Concentração de 60 unidades *in vitro* de SOD parece modificar o efeito antineoplásico de PIC20 e PIC21 em linhagem H460. Contudo, não sendo constatada vantagem adicional a associação SOD;
3. A combinação de PIC20 ou PIC21, na maior concentração ( $10^{-4}\text{M}$ ), com SOD parece exercer ação protetora em linhagem H460. Para confirmação, se faz necessário novos estudos no intuito de verificar a presença das EROs nestas condições, associando estudos que verifiquem a ocorrência da morte celular.
4. O principal processo de diminuição da viabilidade celular metabólica, causado por PIC21, aparentemente não é associado aos efeitos das EROs gerados *in vitro*. Sugerindo que outros mecanismos de ação estão envolvidos na ação do composto;
5. O principal processo de diminuição da viabilidade celular metabólica causado por PIC20, aparentemente, parece estar associado aos efeitos das EROs gerados *in vitro*, uma vez que é observado alterações na viabilidade celular em H460 quando associado ao pré-tratamento com SOD;
6. Em suma, acreditamos que nossas investigações futuras podem conduzir à elucidação dos mecanismos de ação relacionados à ação de PIC20 e PIC21, fornecendo embasamento para a inserção destes fármacos como

opções terapêuticas para o manejo do carcinoma de células grandes, que se configura como um dos grandes desafios à saúde global.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em virtude da importância clínica do presente estudo, nosso grupo pretende prosseguir com as investigações da aplicabilidade de PIC20 e de PIC21 contra o CP, conforme descrito a seguir:

1. Avaliar diferentes condições experimentais, a fim de melhor compreendermos as condições ideais para se obter os benefícios clínicos de PIC20 e de PIC21, como monoterapia ou politerapia combinada com agentes antioxidantes, no tratamento do CP, a saber: i) conduzir ensaios em tempos maiores, 48h e 72h; ii) investigar o aumento gradativo do aparecimento das espécies reativas de oxigênio; iii) avaliar o efeito de diversas concentrações de PIC20 e PIC21 em associações com diferentes tipos de antioxidantes;
2. Realizar citometria de fluxo e microscopia de fluorescência com marcação para superóxido (Dihidroetídio), para observar o nível quantitativo de espécies reativas de oxigênio presente *in vitro* nos tratamentos propostos no presente trabalho; cabe ressaltar que a técnica para a mensuração da fluorescência de dihidroetídio através da citometria de fluxo foi padronizada pelo nosso grupo, gerando dados preliminares (FIGURA A1) e a técnica de microscopia de fluorescência está em processo de otimização (FIGURA A2).
3. Conduzir estudos de determinação dos mecanismos de ação de PIC20 e de PIC21 em monoterapia ou em politerapia combinada com agentes antioxidantes, no tratamento do CP: investigação do possível envolvimento de PI3K, Topoisomerase, caspases, NFkB, dentre outros, e a caracterização do tipo de morte celular que ocorre.
4. De forma análoga a esse experimento, repetiremos os procedimentos, porém em uma nova linhagem de células de câncer de pulmão A549, que também é pertencente histologicamente ao carcinoma de pulmão do tipo NSCLC, porém classificada como adenocarcinoma, como também em células normais para confrontar os dados encontrados no presente estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K. SAITO, H. Menadione toxicity in cultured rat cortical astrocytes. **Jpn J Pharmacol**, v. 72, n. 4, p. 299-306, 1996.
- ADDABBO, F.; MONTAGNANI, M.; GOLIGORSKY, M. S. Mitochondria and reactive oxygen species. **Hypertension**, v. 53, n. 6, p. 885- 892, 2009.
- AITHAL, B. K. et al. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. **Cell Biol Int**, v. 33, n. 10, p. 1039-49, 2009.
- ALBERG, A. J.; SAMET, J.M. Epidemiology of lung cancer. *Chest*, v. 123, n. 1, p. 21S-49S, 2003.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **Cancer Facts and Figures 2013**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036845.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2013.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **How many people get lung cancer?**, 2013. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-smallcell/overviewguide/lung-cancer-small-cell-overview-key-statistics>>. Acesso em: Setembro de 2013.
- ARCHER, S. L. et al. Mitochondrial metabolism, redox signaling and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 $\alpha$ -K<sub>v</sub>1.5 O<sub>2</sub>-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. **Amer J of Physiol. Heart Circul Physiol**, v. 294, n. 2, p. 570–578, 2008.
- ARÊAS, P. C. F. Avaliação da Atividade Antitumoral de Naftoquinonas. 14 de setembro de 2007. 63 folhas. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2007.
- ARNER, E. S; HOLMGREN, A. The thioredoxin system in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v.16, n. 6, p. 420–426, 2006.
- AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs. Oxford: Elsevier, 2008.
- BARVE, A. et al. Gamma-tocopherol-enriched mixed tocopherol diet inhibits prostate carcinogenesis in TRAMP mice. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1693-1699, 2009.



BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. Oxidative decay of DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 32, p. 19633–19636, 1997.

BERRIDGE, M. V. et al. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnol Annu Rev**, v. 11, p. 127-152, 2005.

BEY, E. A. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by beta-lapachone. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p.11832-7, 2007.

BOLTON, J. L. et al. Role of quinones in toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 3, p. 135–160, 2000.

BOOTHMAN, D. A. et al. Isolation of x-ray-inducible transcripts from radioresistant human melanoma cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, n. 15, p. 7200-4,1993.

BRAMBILLA, E.; GAZDAR, A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. **Eur Respir J**, v. 33, n. 6, p. 1485-1497, 2009.

BROGNARD, J. et al. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. **Cancer Res**, v. 61, n. 10, p. 3986-3997, 2001.

CADENAS, E. et al. Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 65, p. 97–146, 1992.

CASS, A. E. G. Superoxide dismutases. **Top Mol Struct Biol**, v. 6, p. 121-56, 1985.

CHANDEL, N. S. et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, n. 20, p. 11715-20, 1998.

CHANDEL, N. S. et al. Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible HIF-1 $\alpha$  during Hypoxia. **J Biol Chem**, v. 275, n. 33, p. 25130-38, 2000.

CHANDRA, J. et al. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n.3-4, p.323-33, 2000.

CHEN, J. et al. The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 197, n. 1, p. 40-8, 2004.

CHOI, B. T.; CHEONG, J.; CHOI, Y. H. Beta-Lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF-kappaB in human colon cancer HCT-116 cells. **Anticancer Drugs**, v. 14, n. 10, p. 845-850.

CHOI, E. K. et al. Upregulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase by radiation potentiates the effect of bio-reductive beta-lapachone on cancer cells. **Neoplasia**, v. 9, n. 8, p. 634-42, 2007.

CONKLIN, K. A. Free Radicals: the pros and cons of antioxidants. Cancer chemotherapy and anti-oxidants. **J Nutr**, n. 134, p. 3201-4, 2004.

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 941–950, 2007.

DAVIDS, R. J. Signal Transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 239 – 52, 2000.

DENG, X. et al. PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 6, p. 1762-1770, 2013.

DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

DUAN, W. J. et al. Silibinin induced autophagic and apoptotic cell death in HT1080 cells through a reactive oxygen species pathway. **J Pharmacol Sci**, v. 113, p. 48-56, 2010.

EIGUREN-FERNANDEZ, A. et al. Atmospheric distribution of gas- and particle-phase quinones in southern California. **Aer Sci and Techno**, v. 42, n. 10, p. 854 – 861, 2008.

ENGELMAN, J. A. et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. **Nature Medicine**, v. 14, n. 12, p. 1351–56, 2008.

ESTEVEZ-SOUZA, A. et al. Antitumoral activity of new polyamine-naphthoquinone conjugates. **Oncology Reports**, v. 20, n. 1, p. 225-31, 2008.

FELIP, E. et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: consensus on pathology and molecular tests, first-line, second-line, and third-line therapy: 1st ESMO Consensus Conference in Lung Cancer; Lugano. **Ann Oncol**, v. 22, n. 7, p.1507-19, 2011.

FERRARI, M.; FORNASIERO, M.C.; ISETTA, A.M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. **Journal of Immunological Methods**, v. 131, n. 2, p. 165-172, 1990.

FILHO, G.B. **Bogliolo. Patologia Geral**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

FISCHER, A. B. Intracellular production of oxygen-derived free radicals. Proceedings of a Brook Lodge Symposium, Augusta, Apr. 1987 ;27-29:99-104.

GAZZERI, S. et al. p53 genetic abnormalities and myc activation in human lung carcinoma. **Int J Cancer**, v. 58, p. 24–32, 1994.

GOKHALE. N. et al. Hydroxynaphthoquinone metal complexes as antitumor agents x:synthesis, structure, spectroscopy and *in vitro* antitumor activity of 3-methyl-phenylazo lawsone derivatives and their metal complexes against human breast cancer cell line MCF-7. **Metal-Based Drugs**, v. 7, n. 3, p. 121- 128, 2000.

HALLAK, M. et al. The anti-leukaemic activity of novel synthetic naphthoquinones against acute myeloid leukaemia: induction of cell death via the triggering of multiple signalling pathways. **Br J Haematol**, v. 147, n. 4, p. 459-70, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. New York: Oxford, 1999.

HAMAJIMA, N. et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism and the risk of eight cancers for Japanese. **Int J Clin Oncol**, v. 7, n. 2, p. 1003-8, 2002.

HANAUSKE, A. R. et al. In vitro chemosensitivity of freshly explanted tumor cells to pemetrexed is correlated with target gene expression. **Invest New Drugs**, v. 25, n. 5, p. 23-417, 2007.

HECHT, S. S. Progress and Challenges in Selected Areas of Tobacco Carcinogenesis. **Chem Res Toxicol**, v. 21, n. 1, p. 160–171, 2008.

HIYAMA, K. et al. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. **J Nat Cancer Inst**, v. 87, n. 12, p. 895-902, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCa). **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**, 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: setembro de 2013.

IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, 1995. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/S05600.html>>. Acesso em: Setembro 2013.

IYER, N. V. et al. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. **Genes Dev**, v. 15, n.2, p. 149-62, 1998.

JEMAL, A. et al. CA: a Cancer Journal for Clinicians, v. 56, n. 2, p. 106-130, 2006.

JENKINS, R. R. Free radical chemistry. Relationship to exercise. **Sports Medicine**, v. 5, n. 3, p. 156-170.

JHA, P. et al. Estimates of global and regional smoking prevalence in 1995, by age and sex. *Amer J Public Health*, v. 92, n. 6, p. 1002-1006, 2002.

JIANG, S.X. et al. Bcl-2 protein expression in lung cancer and close correlation with neuroendocrine differentiation. **Am J Pathol**, v. 148, n. 3, p. 837-846, 1996.

JIMENEZ, C. et al. Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 3, p. 743-753, 1998.

JOANNES, A. et al. Fhit regulates invasion of lung tumor cells. **Oncogene**, v. 29, p. 1203-1213, 2010.

KAMATA, H.; HIRATA, H. Redox regulation of cellular signalling. **Cellular Signaling**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 1999.

KANDOTH, C. et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. **Nature**, v. 502, n. 7471, p. 333-9, 2013.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 10. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

KELLER, J. N. et al. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: Suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. **J Neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 687-697, 1998.

KIM, J. S. et al. Cohypermethylation of p16 and FHIT Promoters as a Prognostic Factor of Recurrence in Surgically Resected Stage I Non–Small Cell Lung Cancer. **Cancer Research**, v. 66, n. 8, p. 4049-4054, 2006.

KIRKIN, V. et al. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1644, n. 2-3, p. 229-249, 2004.

KONGKATHIP, N. et al. Potent antitumor activity of synthetic 1,2-Naphthoquinones and 1,4-Naphthoquinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 14, p. 3179-3191, 2003.

KRIS, M. G. et al. Identification of driver mutations in tumor specimens from 1,000 patients with lung adenocarcinoma: The NCI's Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC). In: American Society of Clinical Oncology Annual Meeting, Abstract CRA7506. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 18, 2011.

KUMAGAI, Y. et al. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 52, p. 221-247, 2012.

LANTUÉJOUL, S. et al. Pulmonary preneoplasia--sequential molecular carcinogenetic events. **Histopathology**, v. 54, n. 1, p. 43-54, 2009.

LEE, J.H. et al. The natural anticancer agent plumbagin induces potent cytotoxicity in MCF-7 human breast cancer cells by inhibiting a PI-3 kinase for ROS generation. **PLoS One**, v. 7, n. 9, e45023, 2012.

LI, X. et al. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 6, p. 1-19, 2013.

LIU, Y et al. Activated  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  Mediated Cell Survival in SU11274-Treated Non-Small-Cell Lung Cancer A549 Cells via c-Met-PI3K-Akt and c-Met-Grb2/SOS-Ras-p38 Pathways. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 119, n. 2, p. 150-159, 2012.

MALTPE, E. et al. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. **Nature**, v. 386, n. 6623, p. 403-7, 1997.

MANDA, G. et al. Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. **Current Chem Biol**, n.3, p. 342 – 366, 2009.

McCORD, J.M. FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, n. 22, p. 6049-55, 1969.

MEY, U. et al. Diagnosis and treatment of diffuse large B-cell lymphoma. **Swiss Med Wkly**, v. 142:w13511, 2012.

MOK, T. S. Personalized medicine in lung cancer: what we need to know. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 8, n. 11, p. 661-68, 2011.

MONKS, T.J.; JONES, D. C. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinine methides, and quinone-thioethers. **Current Drug Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 425–438, 2002.

MONTENEGRO, R.C. et al. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. **Chem Biol Interact**, v. 184, n. 3, p. 439-48, 2010.

MOON, W. S. et al. Expression of Betacellulin and epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma: implications for angiogenesis. **Hum Pathol**, v. 37, n. 10, p.1324–1332, 2006.

MUIR, M. DMSO: Many uses, Much Controversy. Disponível em: <<http://www.dmsol.org/articles/information/muir.htm>>. Acesso em: Setembro de 2013.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Surveillance Epidemiology and End Results (SEER)**. Disponível em: <[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2010/browse\\_csr.php?section=21&page=sect\\_21\\_table.08.html#table5](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/browse_csr.php?section=21&page=sect_21_table.08.html#table5)>. Acesso em: setembro de 2013.

NUTTER, L. M. et al. DNA strand scission and free radical production in menadione-treated cells. Correlation with cytotoxicity and role of NADPH quinone acceptor oxidoreductase. **J Biol Chem**, v. 267, n. 4, p. 2474 – 9, 1992.

O'BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, v. 81, n. 1, p. 1–41, 1991.

PAIK, S. et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med**, v. 351, n. 27, p. 2817-2826, 2004.

PAO, W.; GIRARD, N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 12, p. 175-180, 2011.

PARK, H. J. et al. Heat-induced up-regulation of NAD(P)H:quinine oxidoreductase potentiates anticancer effects of beta-lapachone. **Clin Cancer Res**, v. 11, p. 8866-71, 2005.

PEGRAM, M. D. et al. Trastuzumab and chemotherapeutics: drug interactions and synergies. **Seminars in Oncology**, v. 27, n. 6, p. 21–25, 2000.

PENNING, T. M. et al. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. **Chemical Research in Toxicology**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 1999.

PIKOR, L. A. et al. Genetic alterations defining SNCLC subtypes and their therapeutic implications. **Lung Cancer**, v. 82, n. 2, p. 179-89, 2013.

PINK, J. J. et al. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of beta- lapachone cytotoxicity. **J Biol Chem**, v. 274, p. 5416-24, 2000.

PLANCHON, S. M. et al. beta-Lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. **Exp Cell Res**, v. 267, p. 95-106, 2001.

POOL-ZOBEL, B.; VEERIAH, S.; BOHMER, F. D. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens—focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 591, n. 1-2, p. 74–92, 2005.

PRAMANIK, R. et al. p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun. The determinant roles of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity. **J Biol Chem**, v. 278, n. 7, p. 4831-4839, 2003.

RAVELO, A. G. et al. Recent studies on natural products as anticancer agents. **Curr Top Med Chem**, v. 4, n. 2, p. 1-25, 2004.

RECK, M. et al. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments. **Lancet**, v. 382, n. 9893, p. 709-19, 2013.

REINICKE, K. E. et al. Development of beta-lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 levels. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 8, p. 3055-3064.

ROMOND, E. H. et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, v. 353, n. 16, p. 1673-1684, 2005.

ROSVOLD, E. A. et al. Identification of an NAD(P)H:quinone oxidoreductase polymorphism and its association with lung cancer and smoking. **Pharmacogenetics**, v. 5, n. 4, p. 199-206, 1995.

RUBINSTEIN, L. V. et al. Comparison of *In Vitro* Anticancer-drug-Screening Data Generated With a Tetrazolium Assay Versus a Protein Assay Against a Diverse Panel of Human Tumor Cell Lines. **J Natl Cancer Inst**, v. 82, n. 13, p. 1113-1117, 1990.

SAMALI, A. et al. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 255, n. 1, p. 6-11, 1999.

SAMUELS, Y. et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science**, v. 304, n.5670, p. 554, 2004.

SANDLER, A. et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med**, n.355, p. 2542-50, 2006.

SCAGLIOTTI, G. V. et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol**, n. 26, p. 3543-51, 2008.

SCHILLER, J. H. et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med**, n.346, p. 92-98, 2002.

SCHNEIDER, C. D; DE OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, 2004.

SHAW, A. T. ENGELMAN, J. A. ALK in lung cancer: past, present, and future. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 8, p. 1105–11, 2013.

SHEARER, M. J; NEWMAN, P. Metabolism and cell biology of vitamin K. **Thrombosis and Haemostases**, v. 100, n. 4, p. 530–547, 2008.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 10, p. 813-23, 2006.

SIEGEL, D. et al. The reduction of  $\alpha$ -tocopherolquinone by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase: the role of  $\alpha$ -tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. **Mol Pharmacol**, v. 52, n. 2, p. 300-5, 1997.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, 1986



SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, 407-416, 2003.

SONG, C. W. et al. Anti-cancer effect of bio-reductive drug beta-lapachon is enhanced by activating NQO1 with heat shock. **Int J Hyperthermia**, v. 24, n. 2, p.161-9, 2008.

SU, J-C. et al. Naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione inactivates EGFR and PI3K/Akt signaling pathways in human lung adenocarcinoma A549 cells. **Life Sciences**, v. 86, n. 5-6, p. 207-213, 2010.

SUBRAMANIAN, B. et al. A new paradigm for the development of anticancer agents from natural products. **J Exp Ther Oncol**, v. 5, n. 3, p. 195-204, 2006.

SUZUKI, M. et al. Synergistic effects of radiation and beta-lapachone in DU-145 human prostate cancer cells *in vitro*. **Radiat Res**, v. 165, n. 5, p. 525-31, 2006.

TAGLIARINO, C. et al. Calcium is a key signaling molecule in beta-lapachone-mediated cell death. **J Biol Chem**, v. 276, n. 22, p.19150-9, 2001.

THOMSON, R. H. **Naturally Occurring Quinones**. 2a ed.Academic Press, New York-USA, 1971.

TILLY, J. L. TILLY, K. I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 136, n. 1, p. 242-252,1995.

TRACHOOTHAM, D., et al. Redox Regulation of cell Survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 8, 2008.

TRAVIS, W. D. et al. International Association for the study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. **J Thorac Onco**, v. 6, n. 2, p. 244-85, 2011.

TRUSH, M. A. et al. Analysis of target cell susceptibility as a basis for the development of a chemoprotective strategy against benzene-induced hematotoxicities. **Environ Health Perspect**, v. 104, n. 6, p.1227-34, 1996.

TYAGI, A. et al. Differential effect of grape seed extract against human non-small-cell lung cancer cells: the role of reactive oxygen species and apoptosis induction. **Nutrition and Cancer**, v. 65, n. 1, p. 44-53, 2013.

U.S. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Clinical Trials.gov. Disponível em: <<http://clinicaltrials.gov/ct2/search>>. Acesso em: julho. 2013.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VIEGAS, C. Jr. BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

WALKER, S. Updates in non-small cell lung cancer. **Clin J Oncol Nurs**, v. 12, n. 4, p. 587-596, 2008.

WANG, H. J. et al. Silibinin induces protective superoxide generation in human breast cancer MCF-7 cells. **Rev Cancer**, n. 6, v. 10, p. 813-823, 2006.

WATANABE, N.; FORMAN, H. J. Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 411, n. 1, p. 145-157, 2003.

WIENCKE, J. K. et al. Lung cancer in Mexican-Americans and African-Americans is associated with the wild-type genotype of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase polymorphism. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 6, n. 2, 87-92, 1997.

WISTUBA, I. I. et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Nat Cancer Institute*, v. 89, n. 18, p. 1366-1373, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/don/archive/year/2013/en/>>. Acesso em: Setembro 2013.

WU, D.; CEDERBAUM, A. I. Oxidative Stress and Alcoholic Liver Disease. **Seminars in Liver Disease**, v. 29, n.2, p. 141-154, 2009.

XU, H.L. et al. Juglone, from *Juglans mandshruica* Maxim, inhibits growth and induces apoptosis in human leukemia cell HL-60 through a reactive oxygen species-dependent mechanism. **Food Chem Toxicol**, v. 50, n. 3-4, p. 590-6, 2012.

XU, L. L. et al. The NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene polymorphism and lung cancer: differential susceptibility based on smoking behavior. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 10, n. 4, p. 303-9, 2001.

YANG, S. J. et al. Plumbagin activates ERK1/2 and Akt via superoxide, Src and PI3 kinase in 3T3-L1 cells. **Eur J Pharmacol.** v. 638, n. 1-3, p. 21–28, 2010.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 139-162.

ZUCALI, P. A. et al. Advances in the biology of malignant pleural mesothelioma. **Cancer Treat Rev**, v. 37, n. 7, p. 543-58, 2011.

## APÊNDICE

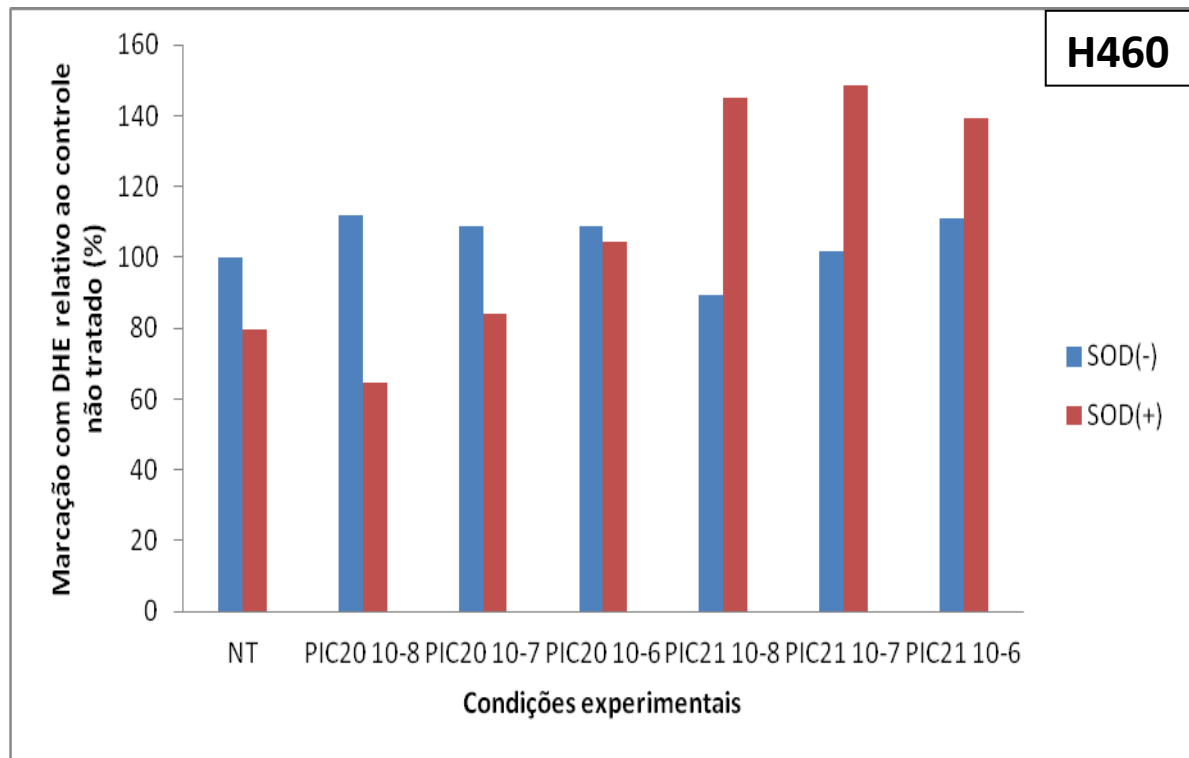


FIGURA A1. Análise da presença de superóxido nas diferentes condições de tratamento em linhagem de CP – H460 através da citometria de fluxo, utilizando DHE como marcador para superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).

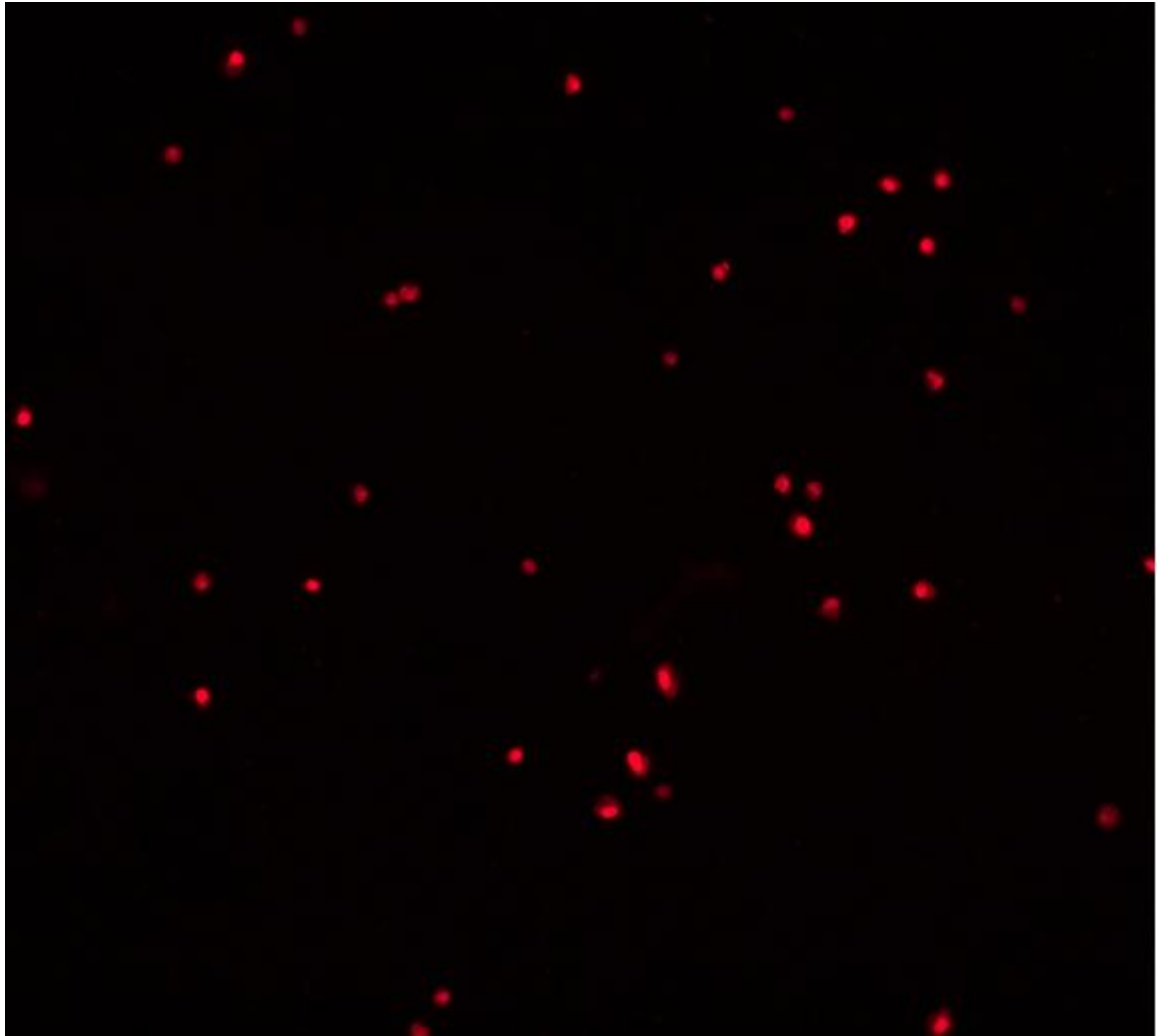


FIGURA A2. Otimização da técnica de microscopia de fluorescência em linhagem de CP – H460, utilizando DHE como marcador para superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).